

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Microbiología III

T 615.33

FUE
est

BIBLIOTECA UCM



530607568X

**Estudio "in vitro" e "in vivo" de diversos
parámetros farmacodinámicos de meropenem y
ciprofloxacino con *S. aureus*, *E. coli* y *P.
aeruginosa*.**

Tesis Doctoral



R. 21.751

Fernando Fuentes Martínez

Madrid, 1994



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
28040 MADRID

D. JOSE PRIETO PRIETO, CATEDRATICO DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA I DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID Y D^a. MARIA LUISA GOMEZ-LUS CENTELLES, PROFESORA TITULAR DE UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA I DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICAN: Que el presente trabajo de investigación titulado: "ESTUDIO "IN VITRO" E "IN VIVO" DE DIVERSOS PARAMETROS FARMACODINAMICOS DE MEROPENEM Y CIPROFLOXACINO CON *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*" constituye la memoria presentada por Fernando Fuentes Martínez para aspirar al Grado de Doctor en C.C. Biológicas, y ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid..

Y para que conste, expedimos y firmamos el presente certificado en Madrid, Mayo de mil novecientos noventa y cuatro.

Fdo. Dr. José Prieto Prieto

Fdo. Dra. María Luisa Gómez-Lus Centelles

Agradecimientos

Mi especial agradecimiento al Dr. Prieto por haberme brindado la oportunidad de realizar esta importante tarea, así como por sus consejos y orientaciones. También a la Dra. Gomez-Lus por su inestimable ayuda en la preparación y revisión de este trabajo.

A mis colegas de equipo, Marta y Jesu, por todo lo que hemos pasado para conseguir resultados de nuestro difícil trabajo.

A todos los que trabajan o han trabajado en este departamento, especialmente a Silvia, Carmen, Charo, Irene, Fernando Minguez, Pedro Barquero y un largo etc.

A mis amigos Roberto, M^a Jesús, Pepi, Manuel, Gerardo, Paco y Gema por su apoyo e interés.

Y por último a mi tía Pura, por valorar tanto mi trabajo y por su interés en el tema.

A Zoila y a mis padres

Indice

ABREVIATURAS	VI
I. INTRODUCCION	1
1. ANTIMICROBIANOS	2
1.1. QUINOLONAS	4
1.1.1. Ciprofloxacino	7
1.2. β -LACTAMICOS: CARBAPENEMAS	9
1.2.1. Meropenem	13
2. FARMACODINAMICA DE LOS ANTIMICROBIANOS	16
2.1. EFECTO POSTANTIBIOTICO	17
2.1.1. Definición del EPA	17
2.1.2. Mecanismo del EPA	17
2.1.3. Determinación del EPA "in vitro"	18
2.1.4. Modelos experimentales en el estudio del EPA	
"in vivo"	20
2.1.5. Factores que afectan al EPA	23
2.1.6. Efectos asociados	25
2.1.7. Aplicación clínica	26
2.2. EFECTOS DE LAS CONCENTRACIONES	
SUBINHIBITORIAS	26
2.2.1. Efectos sobre la morfología bacteriana	27
2.2.2. Efectos sobre el crecimiento de cultivos de bacterias	28
2.2.3. Otros efectos sobre las bacterias	29
II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	30
III. MATERIALES Y METODOS	33
1. MATERIALES	34
1.1. MICROORGANISMOS	34
1.2. ANTIMICROBIANOS	34
1.3. ANIMALES	34
1.4. MEDIOS DE CULTIVO	34
1.5. OTROS PRODUCTOS Y REACTIVOS	35
1.6. INSTRUMENTAL	35
2. METODOS	37
2.1. ESTUDIOS "IN VITRO"	37
2.1.1. Recuento de microorganismos	37

2.1.2. Cálculo de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias y Bactericidas (CMI y CMB)	37
2.1.3. Efecto postantibiótico (EPA)	38
2.1.4. Efecto Bactericida	39
2.1.5. Efecto "in vitro" de las sub-CMI sobre la recuperación de microorganismos en fase de EPA	39
2.1.6. Efecto "in vitro" de las sub-CMI sobre la morfología de microorganismos en fase logarítmica	40
2.2. ESTUDIOS "IN VIVO"	41
2.2.1. Efecto Postantibiótico	41
2.2.2. Control de las concentraciones subinhibitorias y residuales del antimicrobiano en el muslo	45
2.2.3. Efecto bactericida	45
2.2.4. Curvas de letalidad	46
2.2.5. Efecto de los dos antimicrobianos sobre la morfología bacteriana.	47
2.3. ANALISIS ESTADISTICO	48
IV. RESULTADOS	49
1. ESTUDIOS "IN VITRO"	50
1.1. CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS Y BACTERICIDAS (CMI Y CMB)	50
1.2. EFECTO POSTANTIBIOTICO	50
1.3. EFECTO BACTERICIDA	50
1.4. EFECTO "IN VITRO" DE LAS SUB-CMI SOBRE LA RECUPERACION DE MICROORGANISMOS EN FASE DE EPA	51
1.5. EFECTO "IN VITRO" DE LAS SUB-CMI SOBRE LA MORFOLOGIA DE MICROORGANISMOS EN FASE LOGARITMICA	51
2. RESULTADOS "IN VIVO"	53
2.1. EFECTO POSTANTIBIOTICO	53
2.1.1. Tiempo en el que los niveles de antimicrobiano están sobre la CMI y otros parámetros farmacocinéticos.	53
2.1.2. Duración del EPA	54
2.2. CONTROL DE LAS CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS EN EL EPA "IN VIVO"	54
2.3. EFECTO BACTERICIDA	55

2.4. CURVAS DE LETALIDAD	55
2.5. EFECTO DE LOS DOS ANTIMICROBIANOS "IN VIVO" SOBRE LA MORFOLOGIA BACTERIANA	55
2.6. ANALISIS ESTADISTICO	56
V. TABLAS Y FIGURAS	57
VI. DISCUSION	86
1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE EPA	87
1.1. EVALUACION DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES	87
1.1.1. Modelo "in vitro"	87
1.1.2. Modelo "in vivo"	88
1.2. EVALUACION DE RESULTADOS DE EPA "IN VITRO"	89
1.2.1. Ciprofloxacino	89
1.2.1. Meropenem	89
1.3. EVALUACION DE RESULTADOS DE EPA "IN VIVO"	91
1.3.1. Ciprofloxacino	91
1.3.2. Meropenem	92
2. EL EFECTO DE CONCENTRACIONES SUB-CMI "IN VITRO" E "IN VIVO"	94
2.1. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO	95
2.1.1. Meropenem	95
2.1.2. Ciprofloxacino	96
2.2. EFECTO SOBRE LA MORFOLOGIA BACTERIANA	97
2.2.1. Meropenem	98
2.2.2. Ciprofloxacino	101
3. ACTIVIDAD DE MEROPENEM Y CIPROFLOXACINO EN CURVAS DE LETALIDAD "IN VIVO"	104
3.1. MEROPENEM	104
3.2. CIPROFLOXACINO	106
4. LOS PARAMETROS FARMACODINAMICOS EN LOS REGIMENES DE DOSIFICACION	106
4.1. EFECTO POSTANTIBIOTICO	107
4.2. FARMACOCINETICA	109
4.3. CONCENTRACIONES SUB-CMI	110
4.4. CAMBIOS MORFOLOGICOS	110
4.5. OTRAS CONSIDERACIONES SOBRE LOS REGIMENES DE DOSIFICACION	111

VII. CONCLUSIONES	113
VIII. BIBLIOGRAFIA	116

Abreviaturas

C_{\max}	Concentración máxima en suero
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
ECS	Efecto de las concentraciones subinhibitorias
ECS EPA	Efecto de las concentraciones subinhibitorias en bacterias en fase de EPA
EPA	Efecto postantibiótico
PBPs	Proteínas fijadoras de penicilinas
$T > CMI$	Tiempo en que los niveles de antimicrobiano están sobre la CMI
UFC	Unidades formadoras de colonias

I. Introducción

Cuando nació la "quimioterapia", concepto introducido por Paul Ehrlich, comenzó lo que llamamos la "era moderna" del tratamiento antimicrobiano. Desde entonces los logros alcanzados han sido muchos, consiguiendo la medicina uno de los mayores avances en su historia. Esto se ha traducido en una disminución muy importante en la mortalidad y morbilidad en la población.

Pero la evolución de la terapéutica en este intervalo de tiempo se ha visto lleno de dificultades muchas de las cuales no se han superado todavía. Al mismo tiempo, otros obstáculos han surgido en el camino haciendo de la labor investigadora una tarea constante. Así, por ejemplo, el desarrollo de nuevas enfermedades producidas por microorganismos poco habituales, la aparición de resistencias y los efectos tóxicos de los antimicrobianos han sido parámetros que todavía hoy tienen un interés máximo en este campo de la medicina.

Muchas variables hacen que el ideal de un antimicrobiano (que sea selectivo frente al parásito e inócuo para el huésped) sea muy difícil de conseguir. De todos los factores que intervienen en la relación huésped-parásito-antimicrobiano, algunos de ellos no se han estudiado con la suficiente profundidad hasta hace poco tiempo (por ejemplo, la relación del antimicrobiano con el sistema inmune).

Otros parámetros como la sensibilidad de los microorganismos, tal vez el factor más estudiado, han tenido que incluir en su protocolo de investigación nuevos factores que pueden dar un giro en la terapéutica (39). En este sentido, algunas familias de antimicrobianos usados habitualmente están sufriendo o sufrirán variaciones en cuanto a su empleo en la terapéutica de enfermedades infecciosas (9, 19, 32, 39, 46, 77, 88, 121, 138).

1. ANTIMICROBIANOS

La aparición de la sulfanilamida en la medicina hacia 1909 fue el punto de partida de la historia de la investigación antimicrobiana. En esa misma década se encontraron otros compuestos que tenían actividad "in vitro" pero que "in vivo" no parecían ser eficaces. El descubrimiento de la penicilina en 1929 por Alexander Fleming y su posterior purificación en 1940, se consideró como el avance necesario para que los investigadores tomaran en serio la búsqueda de nuevas sustancias que pudieran tener actividad contra otros microorganismos.

La principal fuente posterior de sustancias antibióticas fueron las bacterias pertenecientes al grupo de *Streptomyces*, del cual se han obtenido antibióticos como la estreptomicina, el primero activo frente a bacilos Gram-negativos aerobios. A partir de muchas de estas sustancias obtenidas naturalmente se han logrado otras nuevas por

transformación química, que aventajan a las primeras en algunos puntos como el espectro de acción o su mejor farmacocinética. Otro grupo de antimicrobianos son los sintetizados químicamente, tales como el ácido nalidíxico y oxolónico, etambutol, etc, que revolucionaron y dieron un nuevo empuje a la investigación en este campo.

La clasificación primaria de los antimicrobianos se realiza teniendo en cuenta principalmente criterios de acción antimicrobiana y de estructura química (6):

1. Inhibidores de la síntesis de la pared celular.
 - β -lactámicos, glicopéptidos, bacitracina, lipopéptidos, glicolipopéptidos, fosfomicinas.
2. Inhibidores de ácidos micólicos.
3. Activos sobre membrana citoplasmática bacteriana.
 - péptidos cíclicos, polimixinas.
4. Quelantes de iones metálicos.
 - 8-hidroxi-quinoleínas.
5. Inhibidores de la síntesis de proteínas.
 - aminoglicósidos, macrólidos, lincosamidas, tetraciclinas, cloranfenicol, ácido fusídico, estreptograminas.
6. Inhibidores de ácidos nucleicos.
 - quinolonas, novobiocinas, rifamicinas, 5-nitro-imidazoles, 5-nitro-furanos, antifólicos.

A pesar de la inestimable ayuda que el avance en algunas ciencias, como la genética o la bioquímica molecular, han supuesto para el descubrimiento de los mecanismos de acción de los antimicrobianos, existen todavía hoy muchos puntos oscuros por resolver, aunque la mayoría de los compuestos entran ya dentro de una u otra categoría.

Al mismo tiempo que se iban conociendo estos mecanismos, también se empezaron a estudiar los mecanismos de resistencia de los microorganismos a estos compuestos, problema que se conoce desde la utilización del primer antimicrobiano. Su aparición, favorecida por la gran capacidad de mutación que poseen los microorganismos, es un tema de la máxima actualidad hoy en día (23, 24, 72, 183, 187).

La resistencia a los productos antimicrobianos viene determinada de forma muy general por un cambio en las propias bacterias (adquisición de material genético por transformación, etc...) o en el medio ambiente en que se desarrollan. Un antimicrobiano puede presentar resistencias con muy diferentes mecanismos. Así, podemos encontrar enzimas

modificantes del producto, alteración del objetivo del antimicrobiano o impermeabilidad al paso a través de la membrana (23, 166).

Como consecuencia del mayor conocimiento de estos mecanismos de acción y resistencia y de otros muchos factores que influyen en la eficacia o actividad de los antimicrobianos (farmacología, toxicidad), podemos tener la seguridad de que los nuevos productos y los ya conocidos serán aprovechados para una mejor terapéutica de las enfermedades infecciosas.

1.1. QUINOLONAS

El desarrollo de este grupo de sustancias fue lento y tuvieron que pasar más de quince años desde el descubrimiento del ácido nalidíxico (precursor de las 4-quinolonas), hasta la aparición de las quinolonas fluoradas a finales de los años setenta. Desde entonces han aparecido nuevas fluorquinolonas que han revolucionado la terapia antiinfecciosa por sus buenas propiedades antibacterianas y farmacocinéticas, así como por su inocuidad en el hombre.

Las quinolonas no tienen una **estructura química** básica idéntica, pero sí comparten un esqueleto base que es el anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, abreviadamente 4-quinolona. Derivan de cuatro grupos o subfamilias en las que se introduce una serie de modificaciones que comportan las diferencias entre unas quinolonas y otras. Una característica de los nuevos agentes es la fluoración de la estructura básica llamándose fluorquinolonas, lo que les confiere mejor actividad bactericida y menor frecuencia de aparición de resistencias. Todas ellas son ácidos orgánicos, y por tanto, intensamente lipófilos y con un alto pK.

Clasificación de las 4-quinolonas en subfamilias según su estructura química.

1. Naftiridina.
 - ácido nalidíxico, enoxacina.
2. Cinolina.
 - cinoxacina.
3. Piridopirimidina.
 - ác. piromídico, ác. pipemídico.
4. Quinolona : fluorquinolonas (excepto ác. oxolínico).
 - ác. oxolínico, acrosoxacino, amifloxacino, norfloxacino, ciprofloxacino, ofloxacino, pefloxacino, flumequina, fleroxacino, lomefloxacino, R-835, S-25932.

El **mecanismo de acción** es complejo y no está totalmente claro. El objetivo de la acción de las quinolonas es la ADN-girasa, que cataliza el superenrollamiento negativo del ADN bacteriano (64, 106, 122, 204). Esta enzima está formada por dos proteínas A y B que están codificadas por los genes *gyr-A* y *gyr-B* en *E. coli*; la enzima activa es un complejo A_2B_2 . La subunidad A está implicada en los procesos de rotura y reparación del ADN en el superenrollamiento, mientras que la B es la responsable de la hidrólisis del ATP que se requiere en la acción.

Sin embargo, algunos estudios han propuesto que las quinolonas no se unen a la subunidad A de la girasa sino que forman un complejo con esta subunidad y el ADN, lo que implicaría una interacción directa con el material genético (185). Cuatro moléculas del antimicrobiano se unirían al ADN e intraccionarían entre si hidrofóticamente, proponiéndose una unión a la girasa mediante el carbono 7 de la quinolona. Tanto si la unión es con el complejo ADN-girasa o sólo con la subunidad A de la girasa, los efectos sobre la bacteria serían los siguientes (65, 79, 106):

1.- **Elongación** de la bacteria: al inhibirse la ADN-girasa, se evita la reparación de las roturas en el ADN. Este se elonga dentro de la bacteria.

2.- La unión a la girasa produciría un **bloqueo en el paso de la ADN o ARN** polimerasa que iniciaría la muerte celular inicial.

3.- **Producción de exonucleasas** por la fuerte inducción del gen *recA* del mecanismo SOS de reparación de ADN (observado en *E. coli*) (165); esto llevaría a la muerte celular y lisis. Esto requeriría síntesis de ARN y de proteínas antes de apreciarse la actividad de la quinolona, lo que hace de que la acción bactericida de estas moléculas sea dependiente de la síntesis de ARN. Puesto que las quinolonas también causan inhibición de la síntesis de ARN a altas concentraciones, la acción de estas sustancias seguiría una **respuesta bifásica**, como así sucede en la realidad, ya que estos antimicrobianos muestran una única concentración bactericida óptima (CBO) tal que cualquier concentración más alta o más baja que ésta causará un menor número de muerte bacteriana.

Este parece ser el **mecanismo A** de acción de todas las quinolonas. Sin embargo, se ha propuesto un segundo **mecanismo B** en el caso de ofloxacino y ciprofloxacino en el que la inhibición de la síntesis de ARN no causaría una adicional falta de acción bactericida (106).

La **fijación celular** es rápida (51, 166): cuestión de minutos para enterobacterias y *S. aureus*, disminuyendo con la presencia de iones magnesio o calcio, baja temperatura y Ph

ácido.

La **penetración** en las bacterias Gram-negativas está mejor estudiada que para las Gram-positivas, proponiéndose el siguiente modelo:

- 1) El paso de la membrana externa sería por difusión pasiva a través de poros OmpF o bien vía fosfolípidos.
- 2) El transporte en la membrana citoplasmática es un proceso de difusión, aunque hay alguna evidencia de que esté acoplado a una fuerza protón-motriz.
- 3) Existe un transporte activo en la membrana citoplasmática que extrae la quinolona de la bacteria hacia el periplasma.
- 4) El transporte hacia el exterior posiblemente ocurre a través de poros tipo OmpF, implicando o no a los fosfolípidos.

Como consecuencia de este transporte la quinolona se acumula en la bacteria hasta cuatro veces más que la concentración externa (51).

Su **espectro de acción** es amplio y varía desde algunas especies de bacterias Gram-negativas de las primeras quinolonas, hasta el aumento gradual a otras bacterias en las nuevas sustancias; primero contra enterobacterias y otros aerobios Gram-negativos, más tarde frente a ciertos aerobios Gram-positivos y bacterias intracelulares, y más recientemente contra los anaerobios y ciertos protozoos (7, 8, 64, 65, 182). El efecto es bactericida y, en general, hay una buena correlación entre CMI e inhibición de la ADN-girasa (23).

Ciprofloxacino es la más activa de las disponibles para uso clínico, aunque no deben olvidarse otras propiedades igualmente importantes en la evaluación de un antibiótico. En general no existe efecto inóculo, pero con la CMI sólo se inhibe el crecimiento celular, así que este parámetro no daría una indicación real de la actividad bactericida (122).

Las **resistencias de importancia clínica** que se han encontrado son fundamentalmente cromosómicas (83), por modificación enzimática de la subunidad A de la ADN-girasa (72), o por modificación de la permeabilidad de los poros (93) (probablemente por alteración de los lipopolisacáridos de la pared, que impiden la entrada de estos compuestos dentro de la bacteria). Este último tipo de resistencia es más frecuente en *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Pseudomonas* (79).

Las **características farmacocinéticas** son muy similares entre las quinolonas, exceptuando las denominadas de primera generación (ác. nalidíxico, ác. oxolínico, ác.

pipemídico, ác. piromídico y fluomequina, entre otros). Destaca sobre todo la buena absorción que presentan por vía oral, oscilando el tiempo máximo entre 1 y 3 horas (105). Las constantes de absorción y eliminación son independientes de la dosis administrada por lo que el incremento de la C_{max} y el área bajo la curva es proporcional al incremento de la dosis. La vida media sérica de los nuevos compuestos es elevada, entre 3-4 horas. En general, se unen a proteínas plasmáticas en un bajo porcentaje (normalmente inferior al 50%). La difusión hística es amplia (17), alcanzando en general altas concentraciones en los tejidos periféricos y fluidos orgánicos, oscilando su volumen de distribución entre 1 y 3 l/kg. La penetración en macrófagos y polimorfonucleares es elevada.

La eliminación (203) es mayoritariamente renal (tanto por filtración glomerular como por secreción tubular activa), y un menor porcentaje por ruta transintestinal, aunque hay variaciones y cada caso ha de ser estudiado en particular. La **dosis diaria** oscila entre 200 y 800 mg vía oral (V.O.) y, en general, la cinética de administración V.I. no cambia de manera sustancial (202).

Los **efectos secundarios y toxicidad** (152) son pocos, considerándose a las fluorquinolonas como antibióticos relativamente seguros. Las reacciones adversas más frecuentes afectan al aparato digestivo con náuseas, vómitos y diarreas. Por parte del sistema nervioso central se han descrito insomnios, cefaleas y convulsiones. Se han observado reacciones de fotosensibilidad. Las fluorquinolonas no deben ser usadas en niños debido a un posible daño en el cartílago.

Las **indicaciones** más frecuentes de las quinolonas, especialmente las fluoradas, son en infecciones respiratorias, urinarias, intestinales, osteoarticulares, de la piel y tejidos blandos, infecciones de transmisión sexual e infecciones sistémicas graves (62, 105).

1.1.1. Ciprofloxacino

Estructura química: ciprofloxacino (ácido-1-ciclopropil-6-fluor-1,4-dihidro-4-oxo-7 [1-piperazinil] 3-quinolein carboxílico) es una fluorquinolona con estructura de 4-quinolona de origen sintético (figura 1). La fluoración en posición 6 y el anillo piperazínico en posición 7 han mejorado la actividad de este compuesto, por ejemplo el radical 1-piperacínico en posición 7 potencia notablemente su actividad frente a *P. aeruginosa* (29, 71).

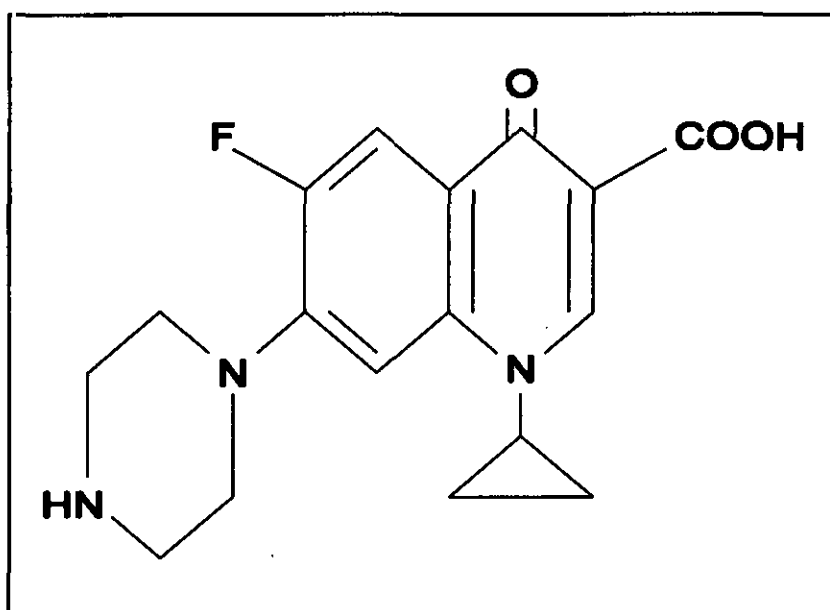


Figura 1. Estructura química de ciprofloxacino

Actividad antibacteriana: su acción es predominantemente bactericida (7, 29, 56, 71) y posee un amplio espectro que abarca cocos y bacilos Gram-positivos y Gram-negativos, aerobios, facultativos y anaerobios, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Rickettsia* y *Micobacterium*. La actividad es particularmente alta sobre enterobacterias y *Pseudomonas*. Actúa tanto en fase de crecimiento exponencial como en fase estacionaria, aumentando su potencia bactericida a pH alcalino y no influyendo las condiciones de aerobiosis o anaerobiosis (71).

Desarrollo de resistencias: aunque no es muy frecuente, se han desarrollado resistencias por mutaciones en la ADN-girasa en varias especies, entre las que se incluyen *S. marcescens*, *K. pneumoniae* y más frecuentemente *P. aeruginosa* (29). También se han observado resistencias cruzadas con las ureidopenicilinas, las cefalosporinas y los aminoglicósidos, probablemente por una mutación cromosómica que implica cambios en los poros de la membrana celular, inhibiéndose así la penetración del antimicrobiano (6).

Farmacocinética: la absorción de ciprofloxacino tras su administración por v.o. es buena (75-80%) y se produce con rapidez alcanzando la C_{max} entre 1 y 1,30 horas después de su administración (18, 49). Por v.i. la concentración sérica disminuye rápidamente (aproximadamente a la cuarta parte de la dosis) en los primeros 30 minutos (29). Su distribución tisular es muy amplia (43). La penetración intracelular es buena y el volumen de distribución en estado estacionario oscila entre 2 y 3 l/kg, por tanto, las concentraciones en los diferentes tejidos orgánicos son elevadas. La unión a proteínas es baja, 20-28%. La vida media de eliminación se sitúa entre 3 y 5 horas (203). Como consecuencia de la eliminación

preferentemente renal, ciprofloxacino alcanza en orina concentraciones muy elevadas.

1.2. β -LACTAMICOS; CARBAPENEMAS

El grupo de los antimicrobianos β -lactámicos ha sido tal vez el más importante tanto por el gran número de compuestos descubiertos o sintetizados que contiene como por su utilización en la quimioterapia. Desde que fue descubierta la primera sustancia del grupo (la penicilina) en el año 1929 hasta hoy, han sido miles los compuestos que en este grupo se han estudiado como posibles antimicrobianos.

Primariamente y por su estructura química, los β -lactámicos se dividen en dos subgrupos con las siguientes subdivisiones (148):

1.- Los derivados del ácido 6-amino-penicilánico (6 A.P.A.)

- Penamas o penicilinas
- Penemas
- Carbapenemas
- Clavamas

2.- Los que derivan del ácido 7-amino-cefalosporánico (7 A.C.A.).

- Cefalosporinas
- Cefamicinas
- Oxacefemas

Los subgrupos que contienen un mayor número de sustancias son los penemas y las cefalosporinas, grupo este último con varias generaciones de moléculas modificadas para dar mayor resistencia a β -lactamasas y más poder bactericida (148).

Los **carbapenemas** difieren del núcleo de los penamas en que tienen un carbono reemplazando un sulfuro en la posición 1 y un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo tiazolidínico. Las dos primeras sustancias de este grupo (ácido olivánico y tienamicina) fueron descubiertas casi al mismo tiempo en la mitad de los años 70 a partir de un programa de búsqueda de nuevas sustancias inhibidoras de la pared celular en el género *Streptomyces* (148). Desde ese momento, otras sustancias fueron descubiertas o parcialmente sintetizadas, como epitienamicina A, las carpetimicinas, asparenomicinas, pluracidomicina A o el SQ 27860, aislado de *Serratia spp.* y *Erwinia spp.*. Sin embargo, estas sustancias no se han utilizado en la clínica aún teniendo en cuenta su estabilidad frente a β -lactamasas y poder bactericida ya que eran bastante inestables químicamente. Solamente un derivado de la

tienamicina, el N-formidoil-tienamicina (imipenem) ha probado una estabilidad y capacidad bactericida suficiente como para ser utilizado clínicamente.

El **mecanismo de acción** de estos antimicrobianos está bastante estudiado, así como el del resto de β -lactámicos. Su objetivo es la unión a proteínas fijadoras de penicilinas (PBPs), que se encuentran en la membrana citoplasmática de la célula (24). La acción bactericida de los β -lactámicos incluye (148):

1.- Penetración a través de la membrana externa y del peptidoglicano por poros OmpF y OmpC en el caso de las bacterias Gram-negativas, ya que la membrana externa actúa como una barrera hidrófoba, impidiendo el paso de sustancia hidrofílicas. Imipenem atraviesa bien esos canales porque contiene una carga positiva y una negativa, y porque su estructura es compacta. En el caso de *P. aeruginosa* los poros se atraviesan mejor, ya que sus canales poseen un diámetro mayor al del resto de enterobacterias. En el caso de Gram-positivos, la penetración en el espacio periplásmico es libre al no poseer membrana externa.

2.- Recorrido a través del espacio periplásmico sin ser inactivadas por las β -lactamasas, enzimas identificadas en la mayor parte de las especies bacterianas y que hidrolizan el anillo β -lactámico.

3.- Fijación sobre el lugar de acción (las PBPs). Estos polipéptidos (de 40.000 a 120.000 daltons) son enzimas transpeptidasas y carboxipeptidasas que realizan su función en la síntesis de peptidoglicano. Esta fijación se debe a la analogía estructural de los β -lactámicos con el dipéptido de alanina. El número de PBPs está en función de las especies, variando de 6 a 8 para las enterobacterias, y de 4-5 para los Gram-positivos. Cada compuesto tiene una afinidad por una PBP distinta, observándose según ello unos efectos distintos en la célula. Se han observado tres efectos morfológicos distintos según la unión del antimicrobiano a las distintas PBPs: formación de **filamentos**, **esferoplastos** con lisis rápida y **formas globosas**. En el caso de imipenem, las PBPs afectadas son las PBP-2, 1a y 1b, así como la 4 y 5, observándose formas esféricas o esferoplastos. Las PBP 1a y 1b tiene como consecuencia la formación de esferoplastos con lisis rápida y la PBP 3 la producción de filamentos.

4.- Lisis bacteriana: la unión a las PBPs origina una detención en el crecimiento por la inhibición de la síntesis de peptidoglicano. Sin embargo, los β -lactámicos también tienen una acción bactericida, producida por la liberación de autolisinas (mureina hidrolasas) que eran inhibidas por la acción de ácidos lipoteicoicos. La liberación de estos ácidos conduce a la lisis del peptidoglucano por parte del sistema autolítico, con la subsiguiente explosión celular.

Las **resistencias de importancia clínica** en el grupo de los β -lactámicos en general y en el de los carbapenemas en particular se suelen encontrar en los distintos niveles de acción de estos antimicrobianos (124, 148):

1.- Alteración de la permeabilidad de la membrana externa en Gram-negativos. Los poros OmpF y OmpC pueden estar alterados en su diámetro e impedir el paso de las moléculas. El poro OmpF tiene mayor diámetro que OmpC, y su mutante es menos resistente a la penetración de las moléculas. Puede haber resistencias cruzadas con aminoglicósidos y ácido nalidíxico, que también utilizan estos poros para su penetración. También puede disminuir el número de poros en la célula. En imipenem se ha observado hasta un 25% de resistencias frente a *P. aeruginosa* debido a cambios de permeabilidad.

2.- Resistencia por β -lactamasas: puede ser de dos tipos: de **resistencia hidrolítica o no hidrolítica**. La primera es la más importante y depende de muchos factores, como la cantidad de enzima sintetizada, afinidad por el antimicrobiano y tipo de enzima. Las β -lactamasas pueden ejercer su acción dentro del espacio periplásmico (enterobacterias y *Pseudomonas*) o en el exterior de la pared (como en *Staphylococcus*). Se han descrito y estudiado muchas β -lactamasas en muchas especies, y su origen puede ser plasmídico o cromosómico. Las más importantes se detallan en la figura 2. Imipenem es estable frente a las penicilinasas de *S. aureus*, *E. coli* y otras enterobacterias (TEM-1, TEM-2 y otras), y presenta moderada estabilidad frente a las derivadas de TEM-2 y SHV-1 activas frente a aztreonam y cefalosporinas de tercera generación. La resistencia **no hidrolítica** se ha observado sobre todo en cefalosporinas, aunque imipenem se ha mostrado como inductor de β -lactamasas de la clase I de Sykes (cromosómicas), pero no modifica su actividad in vitro o in vivo. Una enzima de *B. fragilis* (una zinc metaloenzima) si es capaz de inactivar a imipenem, así como otras de *Aeromonas hydrophilia*.

3.- Alteración de las PBPs por mutaciones: se han observado mutaciones que alteran las PBP, disminuyendo la afinidad de los β -lactámicos a estas proteínas. Normalmente se modifican las PBPs esenciales, como la 1, 2 y 3. Han aparecido tanto en enterobacterias como en *Staphylococcus*.

4.- Tolerancia bacteriana: se ha observado para algunos β -lactámicos y se produce por un aumento de la CMB aunque la CMI permanece constante. Puede ser debido a un déficit de mureína hidrolasa por mutación o persistencia del represor, faltando entonces el mecanismo bacteriolítico.

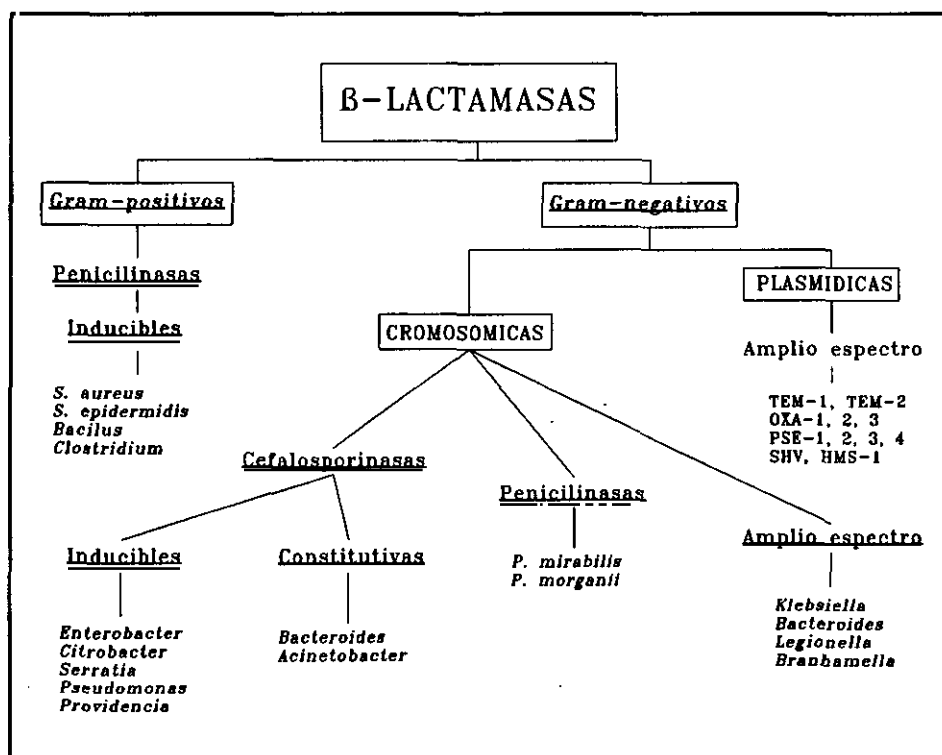


Figura 2. β-lactamasas de Gram-positivos y Gram-negativos.

El **espectro de acción** de los carbapenemas se refieren solamente a imipenem, el único comercializado y probado clínicamente. Es activo frente a bajas concentraciones (0,1-8 mg/l) a casi todos los Gram-positivos, Gram-negativos (incluyendo *P. aeruginosa*), anaerobios (sobre todo *B. fragilis*), micobacterias (199) y *Nocardia spp.*. Solo *P. maltophilia*, *Enterococcus faecium*, algunas cepas de *S. aureus* y estafilococos coagulasa-negativos resistentes a meticilina, *P. cepacia* y corynebacterias son generalmente resistentes a imipenem (24).

Características farmacocinéticas: imipenem no se absorbe por vía oral, ya que se destruye en el estómago. Tras una infusión lenta (20-25 min.) de 500 mg I.V., los niveles séricos oscilan entre 20-60 mg/l. Si la infusión es de 1000 mg, los niveles pueden llegar hasta 52-67 mg/l, siendo 6 horas más tarde de 0,8-1,3 mg/l. Se distribuye ampliamente por todos los órganos con un buen **volumen de distribución**: 0,23 l/kg. La **unión a proteínas** es sólo del 20%. La **vida media** es de 1-1,3 horas en función de la dosis (24).

La **eliminación** es mayoritariamente renal (75%), siendo el 25% restante por mecanismos extrarrenales, presumiblemente por vía metabólica. La excreción renal se produce por filtración glomerular (dos tercios) y el resto por secreción tubular activa. En los

primeros estudios con tienamicina se encontró que sólo una pequeña dosis del agente que se encontraba en orina se encontraba en forma activa. Tras varios estudios se descubrió que había una enzima en el túbulo renal proximal, la **Dihidropetidasa I** (una metaloenzima), que hidrolizaba el antibiótico. La coadministración de **cilastatina** en proporción 1:1 con imipenem, permite recuperar hasta un 70% de la dosis en forma de antibiótico activo y eleva ligeramente los niveles plasmáticos (24).

Los **efectos tóxicos** graves son infrecuentes. En el 5-10% de los pacientes tratados se han comunicado efectos indeseables poco importantes, como trastornos gastrointestinales (náuseas, vómitos y diarreas), reacciones locales (flebitis) y reacciones alérgicas (exantema, leucopenia y eosinofilia). Puede haber una elevación transitoria de las transaminasas o alteraciones en el tiempo de protrombina. No se han descrito efectos nefrotóxicos, ya que la inhibición de cilastatina de la Dihidropetidasa I impide la acumulación de productos tóxicos en el túbulo proximal (24).

Indicaciones: se utiliza en infecciones graves en las que no se conoce aún el agente causal. También en infecciones mixtas como sepsis de origen intraabdominal o ginecológico, septicemia o infecciones en las que han fracasado previamente antibióticos de amplio espectro. La **administración** es por vía intramuscular o intravenosa, con un máximo de 4 g diarios, reduciéndose en un 50% la dosis en pacientes con insuficiencia renal severa (24).

1.2.1. Meropenem

Estructura química: meropenem ((4R,5S,6S)-3-[(3S,5S)-5-dimetilcarbamoilpirrolidin-3-il-tio]-6-[(1R)-1-hidroxietil]-4-metil-7-oxo-1-azabicyclo-[3.2.0]hepta-ene-2-ác. carboxílico) es un nuevo carbapenem semisintético no comercializado similar a imipenem (figura 3). El grupo dimetilcarbamoilpirrolidinetio del carbono 2 parece ser el responsable de la gran actividad frente a *P. aeruginosa* y otras bacterias Gram-negativas (148). El grupo metil del carbono 1 ha sido asociado a la resistencia a la hidrolización frente a las dehidropetidases.

Mecanismo de acción: al igual que imipenem y los demás β -lactámicos actúa uniéndose a las PBP's e inhibiendo su actividad en la formación de componentes vitales para la formación de la pared bacteriana (24, 148). Meropenem ha demostrado una buena afinidad por las PBP's 2 y 3 de *P. aeruginosa*, la PBP 2 de *E. coli* (aunque también se une a la 1a, 1b y 3) y las 1, 2 y 4 de *S. aureus* (108, 148).

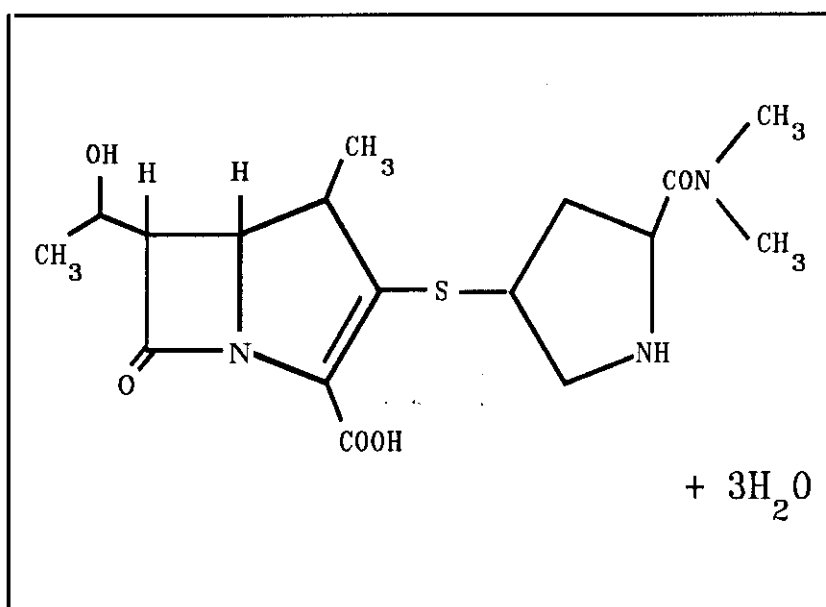


Figura 3.- Estructura química de meropenem.

Actividad antibacteriana: casi todos los patógenos Gram-positivos y Gram-negativos aerobios y anaerobios son susceptibles a la acción de meropenem; las enterobacterias, *P. aeruginosa*, estafilococos meticilin-sensibles, *H. influenzae*, *Neisseria spp*, *B. catarralis*, *Bacillus spp.*, *L. monocytogenes* y casi todos los anaerobios tienen CMI's iguales o inferiores a 4 mg/l. Solamente los enterococos, estafilococos meticilin-resistentes, *Flavobacterium spp.*, *P. maltophilia* y *P. cepacia* tienen elevadas CMI's (108, 148).

Estabilidad frente a β -lactamasas: meropenem se mostró estable frente a la mayor parte de las β -lactamasas tanto de microorganismos Gram-positivos como de Gram-negativos. Solamente fue inestable frente a la cefalosporinasa de *P. maltophilia* y la de *P. cepacia*, siendo resistente a la β -lactamasa de *S. aureus*, a enzimas plasmídicas (incluidas TEM-3 y TEM-5) o cromosómicas de Gram-negativos y la cefalosporinasa de *B. fragilis*. Es inductor de β -lactamasas cromosómicas de la clase I, pero menos que imipenem, no afectando a su actividad (108, 148).

Estabilidad frente a la resistencia intrínseca en *P. aeruginosa*: esta resistencia parece estar determinada por cambios en la permeabilidad de la pared bacteriana. Meropenem parece ser más estable a esta resistencia que imipenem y ceftazidima. Cuando la CMI de carbenicilina es alta (> 128 mg/l), indicando cepas de alta resistencia, meropenem incrementó su inestabilidad por encima de imipenem (124).

Farmacocinética: tras una dosis de 1000 g. vía I.V., la concentración máxima (50-55

mg/l) se alcanza en aproximadamente 0,5 h.. **La distribución** en estado estacionario por los tejidos es buena, siendo el volumen de distribución de aproximadamente 19 l. La **vida media** es alrededor de 1 h., tanto para dosis de 1000 mg. como para 500 o 250 mg. (12). La **unión a proteínas** es más baja que para imipenem, con un 13% frente al 22% respectivamente (108). La **eliminación** es principalmente renal por secreción tubular, recuperándose hasta el 70% de la dosis; un 20% se recupera en forma metabolizada (ICI 231.689). La recuperación del **antimicrobiano activo** en orina es alta, de un $79 \pm 2\%$, equiparable a la obtenida normalmente por imipenem cuando se administra con cilastatina. Esto indica que meropenem es estable frente a la **dihidropeptidasa I renal**, no necesitando una coadministración de un inhibidor de esta enzima (12).

530607568X

2. FARMACODINAMICA DE LOS ANTIMICROBIANOS

La farmacodinámica trata de la actividad de un antimicrobiano en el curso del tiempo y de los mecanismos de acción y otros efectos de estas sustancias en las bacterias (figura 4). Los parámetros farmacodinámicos están teniendo cada vez más importancia en el diseño de nuevos regímenes de dosificación (110, 117, 134). Hasta hace pocos años, la dosificación de los antimicrobianos se basaba en simples parámetros farmacocinéticos, y las dosis se administraban para mantener el mayor tiempo posible los niveles del antimicrobiano por encima de la concentración óptima e impedir que los microorganismos recuperaran el crecimiento (39, 68, 75, 88, 92, 98, 184).

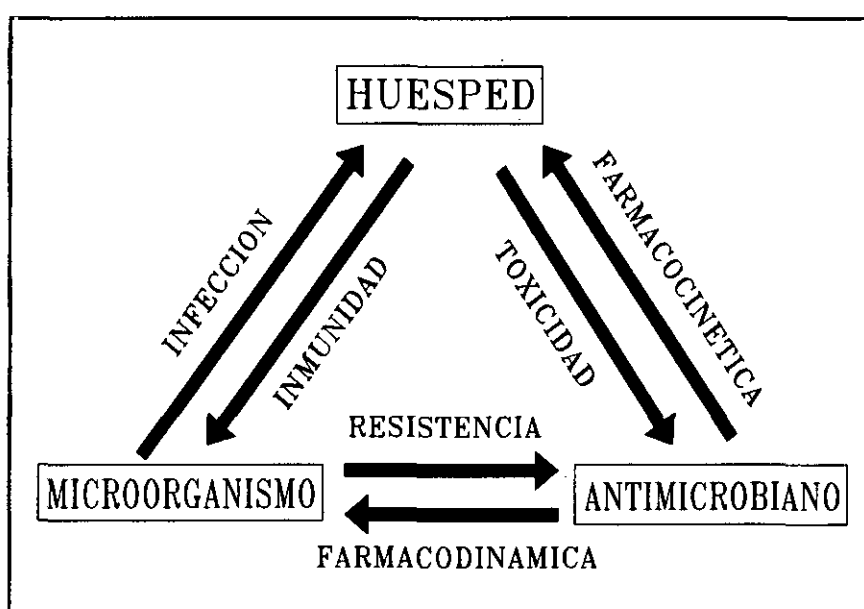


Figura 4.- Interacciones Huésped-antimicrobiano-parásito.

Una motivación para introducir los parámetros farmacodinámicos en el estudio de la dosificación de antimicrobianos ha sido la de reducir costes sin reducir la eficacia de estos agentes. Por otro lado, algunas infecciones en pacientes con insuficiencia renal severa podrían ser tratadas si las dosis tuvieran la misma actividad aunque fueran más bajas (39).

El estudio estandarizado de estos parámetros farmacodinámicos ha comenzado hace poco tiempo, aunque las primeras observaciones se hicieron hace muchos años (20, 53, 54, 55, 162). Algunos de estos fenómenos se estudian de forma relacionada y sus implicaciones y mecanismos de acción no se conocen en profundidad.

2.1. EFECTO POSTANTIBIOTICO

Al mismo tiempo que las primeras sustancias antimicrobianas empezaban a aplicarse en la terapéutica y en estudios en laboratorio, algunos investigadores ya notaron que existía un visible retraso en el crecimiento de microorganismos que habían sido expuestos a antibióticos durante cortos espacios de tiempo. Así, Bigger (20) hacia 1944, lo relata en pruebas con *Staphylococcus* y *Streptococcus* y penicilina G. A partir de entonces, otros autores como Parker y cols. (162), estudiaron este efecto y lo demostraron con el mismo antibiótico (penicilina G) y *Staphylococcus*, tras una exposición de 5-30 minutos.

Tras este descubrimiento, Eagle y cols. (20) hicieron un estudio tanto "in vitro" como "in vivo", utilizando también otros cocos Gram-positivos, pero no consiguieron determinar las concentraciones de antimicrobiano en suero. Otros modelos "in vivo" fueron utilizados por otros autores, aunque la sensibilidad del método no parece estar muy demostrada.

No fue hasta los años 70 cuando estas observaciones y estudios preliminares fueron aplicados a otros antimicrobianos y bacilos Gram-negativos (74, 142, 143, 196, 200). Ha sido entonces cuando ha empezado a haber una estandarización de las técnicas hasta entonces empleadas tanto "in vitro" como "in vivo", y a definirse de una forma aceptable para todos el verdadero significado de este efecto, que se denominó como efecto postantibiótico (EPA).

Aunque en los últimos años se ha avanzado mucho en el estudio de este fenómeno, es mucho el trabajo que queda por hacer en cuanto a la comprensión de este efecto, así como a una mayor estandarización de las técnicas y una aplicación de los resultados en la terapéutica antimicrobiana (5, 14, 28, 89, 90, 91, 92).

2.1.1. Definición del EPA

Mc Donald (143) definió el EPA como la supresión de crecimiento bacteriano que persiste tras una limitada exposición de los microorganismos a un antimicrobiano. Es tal vez la definición más aceptada, ya que enfatiza el hecho de que no se debe a la acción de antimicrobiano residual, sino a una previa exposición a este.

2.1.2. Mecanismo del EPA

Conocer los mecanismos por los que los antimicrobianos inducen EPA en los microorganismos es una difícil tarea, ya que las diferencias en la duración de este efecto en las distintas combinaciones antimicrobiano-microorganismo sugieren que deben existir varios

mecanismos implicados. La explicación más generalizada y razonable apunta a que los daños no letales producidos por los antimicrobianos producen un retraso en el crecimiento normal de la bacteria. Los aminoglicósidos, por ejemplo, se unen al ribosoma impidiendo la síntesis de proteínas, de manera que los largos EPA que producen tanto "in vitro" como "in vivo" representaría el tiempo necesario para la síntesis de nuevos ribosomas, o la disociación del antimicrobiano de su objetivo (39, 134). En los macrólidos, con el mismo objetivo celular que los aminoglicósidos, tendrían un mecanismo parecido, aunque algunos estudios parecen demostrar que es otro (39, 78, 134). En las quinolonas, que inhiben a la ADN-girasa, el EPA representaría el tiempo necesario para la disociación del antimicrobiano del complejo ADN-girasa, y la reparación del ADN.

En el caso de los β -lactámicos, no se ha encontrado EPA significativo frente a Gram-negativos. Como estos antimicrobianos se unen a proteínas fijadoras de penicilinas (PBPs) que actúan en la síntesis de peptidoglicano, una posible explicación es que el EPA es el tiempo requerido por la célula para sintetizar de nuevo estas proteínas o el necesario para la disociación del complejo PBP-antimicrobiano (39). Cada β -lactámico tiene una o varias PBPs específicas donde actuar en cada especie bacteriana, con lo que el EPA variaría con cada combinación de antimicrobiano-microorganismo. La falta de EPA de los Gram-negativos en la mayoría de los β -lactámicos sería debida a una rápida disociación de estas moléculas de las PBPs a que están unidas.

Sin embargo, los carbapenemas sí parecen presentar un EPA significativo frente a Gram-negativos (5, 28, 39, 137). Se podría explicar por la gran afinidad a las PBPs y rápida difusión por el espacio periplásmico (134). Otra explicación puede ser la de que se une preferencialmente a la PBP-2, a diferencia de los otros β -lactámicos (39, 61). Sin embargo se ha demostrado con mutantes de *E. coli* que el EPA era el mismo cuando la PBP-2 era inactivada térmicamente (136). Otras familias de antimicrobianos no han sido estudiadas o su mecanismo no se conoce muy bien.

2.1.3. Determinación del EPA "in vitro"

Se han utilizado una gran variedad de técnicas para el cálculo del EPA "in vitro", pero casi todas ellas se basan en los mismos pasos: cuantificar el crecimiento tras la eliminación del antimicrobiano. Para este segundo proceso, se han utilizado principalmente cuatro métodos (39):

- **Lavado del antimicrobiano:** se realiza mediante la centrifugación de los caldos de cultivo a unas 1200 x g durante unos 5-10 minutos, eliminando luego el

sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en medio fresco (25, 142, 143). La mayoría de los investigadores realizan al menos dos centrifugaciones para asegurar una total supresión del antimicrobiano. La mayor desventaja de este método es que las bacterias pueden mostrar un retraso en el crecimiento (89) debido a efectos mecánicos de la centrifugación.

- **Inactivación del antimicrobiano por medio de enzimas:** es un método más simple y rápido que los otros dos, pero con el inconveniente de que es casi exclusivo de los β -lactámicos (20, 53, 54, 55), ya que no se disponen de enzimas comercializadas que inactiven otros antimicrobianos o no son muy eficaces.

- **Dilución del cultivo:** este método es bastante simple, y consiste en diluir un el cultivo con los microorganismos y el antimicrobiano en medio fresco (39, 146). La dilución depende de la concentración de antimicrobiano, utilizándose 10^{-3} si es mayor que la CMI (18). El inóculo inicial debe ser de al menos 10^5 - 10^6 UFC/ml para que pueda cuantificarse posteriormente su crecimiento. Se puede aplicar a cualquier antimicrobiano, aunque se corre el riesgo de no poder detectar crecimiento si éste tiene un poder bactericida muy grande.

- **Exposición de microorganismos en un filtro o membrana:** las bacterias en esta membrana se colocan en una placa que contiene agar con antimicrobiano, que difunde por la membrana (131). El lavado se produce por repetidas transferencias a placas con agar sin antimicrobiano. Las ventajas son que los microorganismos sufren menos daño al no haber tantos efectos mecánicos (cambios osmóticos, etc.), pero tiene el inconveniente de ser más incómodo y trabajoso que el de dilución o inactivación por enzimas.

Se han desarrollado otros modelos "in vitro" que simulan las concentraciones fisiológicas del antimicrobiano, aunque poseen el problema de no poder separar el EPA de los efectos de las concentraciones subinhibitorias del antimicrobiano.

- **Modelos de dilución repetida:** consiste básicamente en realizar continuas diluciones de un frasco de cultivo con antibiótico, añadiendo un volumen de medio fresco igual al extraído (77). El mayor problema es que se diluyen los microorganismos junto con el antibiótico.

- **Modelos de diálisis:** se establece una diálisis entre un sistema cerrado que contiene el microorganismo y que está separado de otro, que contiene medio fresco,

por una membrana semipermeable (21, 191). El antimicrobiano puede añadirse a un sistema u otro, según el modelo de absorción IV o IM. La ventaja sobre el método anterior es que no se diluyen los microorganismos.

La mayoría de estos métodos utilizan el **recuento de UFC/ml** para seguir la cinética de crecimiento, por lo que en un principio se estimó el período de EPA como un período estacionario de crecimiento que se traducía en un intervalo llano de la curva frente al tiempo (53, 54, 55, 162). Sin embargo, han aparecido otros métodos de seguimiento de la curva de crecimiento como la **medición de cambios en la conductancia eléctrica** (5, 82), **cambios en la concentración intracelular de ATP** (94, 111), **espectrofotometría** (15, 169), **recuento electrónico de partículas** (151) o **cambios en la morfología** (131). Algunos métodos han dado EPA más largos que el recuento en placa, pero en general tienen buena correlación.

En un intento de estandarizar un método para poder comparar resultados entre varias metodologías, se utiliza la fórmula $EPA = T - C$ (39, 143), en la cual **T** representa el tiempo necesario para los microorganismos expuestos a antimicrobiano en incrementar 1 Log_{10} su concentración en el momento del lavado o dilución, mientras que **C** es el tiempo requerido por los microorganismos control para incrementar también su concentración en 1 Log_{10} a partir del mismo tiempo. La razón de utilizar 1 Log_{10} se debe a que en la mayoría de los microorganismos, suele ser el momento en el que se recobra el crecimiento normal.

Muchos agentes antimicrobianos, por ejemplo β -lactámicos y fluorquinolonas, alteran la morfología bacteriana e inducen filamentación en bacilos Gram-negativos (39, 132). Los filamentos son células que contienen varios genomas dentro de un citoplasma común (129) y, cuando se determinan cinéticas de crecimiento, se asume que una bacteria corresponde con una UFC, cuando en realidad cada colonia corresponde a un filamento. Este recuento de UFC por filamento puede conducir a una sobreestimación del efecto postantibiótico en ciertos antimicrobianos. Lorian (131) define el EPA como el período de tiempo que comprende desde el estado de inactivación enzimática del microorganismo a partir de eliminación del antibiótico, hasta el momento en que las enzimas recuperan su funcionalidad. Según este autor la morfología bacteriana refleja las variaciones en la actividad de esas enzimas, y define el **EPA morfológico** como el tiempo necesario para que una población de filamentos Gram-negativos alcance la proporción de un 10% de filamentos y un 90% de bacilos, lo cual indicaría el final del EPA.

2.1.4. Modelos experimentales en el estudio del EPA "in vivo"

Aunque son muchos los datos que se pueden encontrar sobre EPA "in vitro", no

encontramos muy fácilmente casos de estudios "in vivo". En teoría, se podría evaluar este efecto en cualquier tejido o fluido corporal en el que fuera posible un recuento de UFC y una medición de la concentración de antimicrobiano. De todas formas, los estudios "in vivo" deben ser analizados cuidadosamente para tener en cuenta todos los factores que pueden tener relación con los resultados obtenidos (10, 13, 36, 63, 107, 206, 207, 208).

Desde los primeros estudios que se realizaron, sólo cinco modelos animales han sido usados para cuantificar este efecto (39):

-Modelo de infección en muslo de ratón: es tal vez el más utilizado. Ya Eagle y cols. (55) lo emplearon para ver el efecto de la penicilina G sobre los estreptococos "in vivo". Otros investigadores lo utilizaron también con nuevas penicilinas sobre Gram-negativos.

Estos experimentos se realizaban sobre ratones inmunológicamente sanos, hasta que Vogelman, Craig y cols. (89, 90, 198) lo modificaron inmunodeprimiendo a los ratones, con lo que el efecto del sistema inmune quedaba anulado.

Este modelo tiene muchas ventajas (147); primero es relativamente barato, el sistema inmune no interfiere, el muslo del ratón puede extraerse fácilmente, y cuantificar el número de UFC en el homogenizado no presenta dificultades. El único problema que se presentó en un principio fue el de conocer la concentración de antimicrobiano en el muslo, para posteriormente cuantificar el EPA. Ryan y Cars (88) demostraron mediante la implantación de piezas de algodón en el músculo, que los niveles de varios β -lactámicos en el líquido intersticial eran aproximadamente los mismos que en el suero, con un pequeño retraso (11, 35, 37, 59, 116, 139). Para asegurarse de que posibles niveles residuales de antimicrobiano tuvieran actividad, Vogelman y Gudmundsson (198) re infectaron a los ratones tratados con microorganismos en fase exponencial, viendo que crecían normalmente.

- Modelo de meningitis en conejos: autores como Sande y cols. (179, 190), utilizaron este modelo puesto en práctica por ellos para estudiar el efecto de una sola dosis de ampicilina sobre *S. pneumoniae*. Este modelo tiene algunas ventajas sobre el anterior, como que la concentración de antimicrobiano puede hallarse fácilmente en el sitio de infección, o que el EPA puede determinarse para cada animal separado. Sin embargo, cuando en posteriores estudios se inyectó penicilinas en el líquido cerebroespinal, los microorganismos crecieron normalmente, lo que demostraba que los niveles sub-CMI eran activos. La falta de EPA con penicilina G y neumococo en

este modelo es consistente con los datos encontrados en el modelo anterior.

- **Modelo de endocarditis en ratas:** en este modelo, utilizado también por varios autores (52, 101, 102, 103, 110), se produce una endocarditis en las válvulas aórtica o tricúspide mediante la introducción de un catéter en la arteria carótida o vena yugular, por el que se inocula 24 horas después 10^7 UFC del microorganismo que se vaya a utilizar. El 100% de las ratas desarrollan endocarditis en pocas horas. Un día más tarde, se administra el antimicrobiano por vía intramuscular, y posteriormente se determinan el número de UFC y concentración de antimicrobiano en las vegetaciones producidas en las válvulas mediante técnicas estándar (bioensayo, RIA). La principal desventaja de este modelo es su laboriosidad y que no es demasiado barato como para hacer los estudios extensivos a muchos antimicrobianos.

Otros modelos han utilizado bacterias pretratadas "in vitro" que luego son inoculadas o expuestas "in vivo", como:

- **Modelo de cámaras en conejos:** este modelo es tal vez el menos utilizado de todos (31, 118, 153, 154), aunque no es más complicado que el anterior. Se utilizan unas cámaras de acero en forma de red (llamadas TCF o Tissue Cage Fluid) que contienen unos 4 ml de un buffer, y que son implantadas cuatro semanas antes del experimento en la espalda de conejos sanos. En estas cuatro semanas, las cámaras se rodean de tejido conectivo y se establece un equilibrio entre los líquidos intersticiales y de la cámara. En el día del experimento se introducen en las cámaras 0,4 ml de suspensión con microorganismos que previamente han sido expuestos a la acción de antimicrobiano "in vitro". Cada tiempo de muestra se extrae una parte del líquido y se hallan las UFC y concentración del antimicrobiano, determinando la duración del EPA. En realidad, es una determinación del EPA "ex-in vivo", y lo que podemos observar es el efecto de las defensas del huésped frente al microorganismo, ya que los animales son inmunológicamente sanos y nosotros medimos las diferencias con microorganismos en fase normal de crecimiento.

- **Modelo de piezas de algodón en ratones:** Renneberg y Walder (167, 168, 174) han puesto a punto este modelo que junto con el de infección en muslo son probablemente los mejor estandarizados. Se implantan subcutáneamente piezas de algodón empapadas de una solución con bacterias en la espalda de ratones normales, administrándose dos horas más tarde el antibiótico V.I. Posee grandes ventajas: extrayendo las piezas puede determinarse la concentración de antibiótico en el sitio de infección, posibilidad de controlar la acción de las concentraciones subinhibitorias por

intercambio de dichas piezas con los de ratones sin tratar, y por último que permite trabajar con diferentes bacterias a la vez.

El recuento bacteriano se realiza como en "in vitro", por dilución y siembra en placa de agar, en este caso de homogeneizados de los tejidos o fluidos infectados. Posteriormente se realizan curvas de crecimiento en los animales controles y tratados en \log_{10} UFC/muslo, ml o vegetación, según la técnica, respecto al tiempo (en horas), y sobre ellas se calcula el EPA. Actualmente existen dos fórmulas para la cuantificación del EPA que difieren ligeramente entre sí:

A) Una desarrollada por Vogelmann y cols. (198).

$$\text{EPA} = T - C - M$$

donde M representa el tiempo en que los niveles de antimicrobiano en suero exceden la CMI, T es el tiempo requerido para que el número de UFC en los animales tratados incremente 1 log a partir del tiempo M, y C es el tiempo para que el número de UFC en los animales control incremente 1 log a partir del momento en que se administra el antimicrobiano.

B) y otra empleada por Renneberg y Walder (1968).

$$\text{EPA} = T - C$$

donde T es el tiempo requerido para que el número de UFC en los animales tratados incremente 1 log a partir del tiempo en que los niveles de antimicrobiano descienden de la CMI (factor M en la fórmula de Vogelmann), y C es el tiempo requerido para que el número de UFC en animales control incremente 1 log a partir del momento en que se administra el antibiótico.

Es probable que en la primera fórmula se produzca una subestimación del efecto postantibiótico, ya que el tiempo que los niveles de antimicrobiano están sobre la CMI es considerado dos veces: una en el término T, y otra en M. El valor de EPA es mayor que en la segunda ecuación que en la primera.

2.1.5. Factores que afectan al EPA

Son muchos los factores pertenecientes al microorganismo, antimicrobiano y técnica

utilizada que pueden afectar la duración del EPA tanto "in vitro" como "in vivo". Algunos están bien establecidos, como la concentración y clase de antimicrobiano o la duración de la exposición. Otros están por investigar, como tamaño del inóculo, pH, agitación, etc. A continuación se enumeran algunos de ellos:

- **Tipo de antimicrobiano y microorganismo:** este efecto se puede encontrar en casi todos los microorganismos y antimicrobianos, aunque hay diferencias apreciables entre ellos. Muchos estudios (39, 88, 89) parecen demostrar que los Gram-positivos (*S. aureus* sobre todo) exhiben EPA con casi todos los antimicrobianos, si bien los β -lactámicos lo inducen en menor cuantía que los inhibidores de la síntesis de proteínas (aminoglicósidos). En contraste con estos datos, los observados con bacilos Gram-negativos demuestran que los β -lactámicos no inducen EPA sobre cepas estándar como *E. coli* o *P. aeruginosa*, aunque si lo producen con casi todos los demás antimicrobianos, como macrólidos, quinolonas y aminoglicósidos. Con los anaerobios ocurre algo parecido a los bacilos Gram-negativos, aunque los datos obtenidos son menos numerosos.

- **Concentración de antimicrobiano:** en el caso de los β -lactámicos, los datos obtenidos parecen indicar que sólo se produce un apreciable EPA cuando las concentraciones ensayadas son de 8-32 veces la CMI, sobre todo con Gram-negativos (39). Con los demás antimicrobianos, el EPA parece ser proporcional a la concentración, aunque hay otros parámetros que también influyen (nivel máximo en suero, dosis total, etc...).

- **Duración de la exposición:** al igual que la concentración, la duración de la exposición también aumenta la duración del EPA en β -lactámicos, aunque se corre el riesgo de que no podamos luego determinar la concentración por una muerte masiva. Otros antimicrobianos, como los aminoglicósidos parecen depender de otros parámetros como el área bajo la curva de concentración, o dosis total administrada (39).

- **Efecto del tamaño del inóculo:** sólo se ha examinado este efecto con *S. aureus*. Eagle y cols. (54) observaron que frente a altas concentraciones de microorganismos, la penicilina G no inducía EPA sobre *S. aureus*. También se ha observado este efecto con eritromicina sobre la misma cepa.

- **Fase de crecimiento del microorganismo:** en estudios tanto con penicilina y *S. aureus* como con gentamicina y *P. aeruginosa* (39), revelan una duración similar

con microorganismos tanto en fase de crecimiento como en período estacionario. Normalmente se utilizan en todas las técnicas bacterias en fase logarítmica de crecimiento, aunque no todos los antimicrobianos son activos en esta fase de crecimiento (60).

- **Agitación:** tampoco parece haber diferencias entre el uso de agitación mecánica en la determinación del EPA "in vitro", aunque ha habido algún caso en el que se han encontrado diferencias, como ampicilina frente a *E. coli*, donde la agitación disminuyó el EPA de 1.4 a -0.6 horas (39, 119).

- **Tipo de medio y pH:** se ha dado algún caso en el que el medio ha afectado la duración del EPA; por ejemplo, Bundtzen (25) examinó el efecto de suero humano, encontrando que había una significativa reducción cuando *E. coli* se exponía a tetraciclina o rifampicina con o sin suero al 90%. Más tarde se demostró que también la CMI aumentaba, con lo que la relación CMI-dosis no había variado. El pH parece influir en algunas familias de antimicrobianos más que en otras; en quinolonas y aminoglicósidos, el pH ligeramente ácido (5,5) redujo el EPA en algunos experimentos en nuestro laboratorio. También en levaduras el pH 5,3 aumentó el EPA en estudios de otros autores (101).

2.1.6. Efectos asociados

Se encuentran principalmente dos efectos relacionados con el EPA. Estos son:

- **Mayor susceptibilidad a la acción de leucocitos (PALE):** Mc.Donald y Pruul (144) y luego otros investigadores (47, 126) demostraron que las bacterias expuestas durante corto espacio de tiempo a ciertos antimicrobianos (en fase de EPA), eran más susceptibles a la actividad fagocitaria de los leucocitos. En general los Gram-negativos mostraron más PALE con inhibidores de las proteínas que con los β -lactámicos. Craig y Gerber (38) demostraron este efecto también "in vivo", al observar que bacterias en fase de EPA inyectadas en muslos de ratones eran eliminadas antes que bacterias en fase de crecimiento.

- **Disminución de la actividad bactericida durante el EPA:** algunos antimicrobianos estudiados parecen demostrar que la actividad de estos sobre bacterias en fase de EPA está disminuida (195). Según estos estudios, el grado de inhibición parece ser dependiente del microorganismo (más en bacilos Gram-negativos que en cocos Gram-positivos) y del antimicrobiano (β -lactámicos y trimetoprim más que aminoglicósidos). De todas formas se necesitan más datos tanto de experimentos "in vitro" como "in vivo" que demuestren más

eficazmente este efecto en los antimicrobianos estudiados.

2.1.7. Aplicación clínica

La aplicación más clara del EPA y de sus efectos asociados es en los protocolos de dosificación de los antimicrobianos de uso común. Así, antimicrobianos que induzcan un EPA prolongado frente a un microorganismo, podrán administrarse de forma intermitente sin miedo a perder eficacia, lo que tendría un menor costo. En el caso de pacientes con riesgo de alta toxicidad, este hecho permitiría rebajar la dosis sin perder eficacia (39). Para verificar esta aplicación, se han estudiado algunos antimicrobianos con prolongado EPA con el modelo de infección en muslo de ratón (38, 197), comparando protocolos de dosificación continuos o intermitentes mediante la disminución de UFC. Los resultados de los dos modelos de administración con antimicrobianos que inducen EPA prolongado (gentamicina y eritromicina) fueron iguales, mientras que con antimicrobianos sin EPA (β -lactámicos) el régimen continuo fue más eficaz.

El estudio de esta aplicación clínica puede llegar a cambiar la actual dosificación de algunos antimicrobianos muy utilizados, como los aminoglicósidos.

2.2. EFECTOS DE LAS CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS

Otra serie de factores farmacodinámicos no relacionados de forma directa con el EPA son los efectos de concentraciones subinhibitorias sobre las bacterias. Aunque estos fenómenos están empezando ahora a estudiarse siguiendo una metodología igual para todos los investigadores, las primeras observaciones, al contrario que el EPA, no se realizaron hasta los años 70 (170, 171).

La importancia de estos efectos es de gran relevancia ya que concentraciones residuales de antimicrobiano son siempre encontradas tras la administración a los pacientes de dosis terapéuticas. Si estas bajas cantidades de antibióticos tuvieran algún efecto sobre las bacterias y este pudiera ser cuantificado al igual que el EPA, la eficacia de los antimicrobianos no se vería tan afectada en administraciones más espaciadas de estos agentes.

Los efectos de las concentraciones sub-CMI incluyen desde cambios en la morfología y ultraestructura de las bacterias, hasta los producidos en la virulencia o fagocitosis de estas. Algunos de estos fenómenos han sido mejor estudiados que otros, por lo que sus mecanismos están mejor comprendidos. La mayoría de estos trabajos de investigación han sido llevados a cabo "in vitro", aunque también ha habido algunos realizados "in vivo" que parecen confirmar los datos obtenidos hasta ahora (160, 161).

2.2.1. Efectos sobre la morfología bacteriana

Los cambios en la morfología de las bacterias se han estudiado tanto con microscopio de luz como electrónico, ya que este segundo medio permite la observación de alteraciones en la ultraestructura de las células (129, 132). La **Concentración Mínima de Antimicrobiano** (CMA, término definido por Lorian y cols.) (127, 132, 133) que produce modificaciones en la estructura celular suele estar entre un tercio a un octavo de la CMI, dependiendo del antimicrobiano, aunque en determinados combinaciones antimicrobiano-bacteria se pueden encontrar CMA de $1/20 \times$ CMI.

La mayoría de los estudios se han llevado a cabo "in vitro", aunque los obtenidos "in vivo" han corroborado significativamente estos datos. Los métodos utilizados "in vitro" se pueden dividir en dos categorías:

- **estudios en medios líquidos:** llevados a cabo en medios como caldo TSB o MH, mediante la exposición de microorganismos a concentraciones sub-CMI y posterior observación al microscopio.

- **estudios sobre superficies sólidas o semisólidas:** sobre placas de agar MH, bien sea por crecimiento en su superficie y **exposición a discos de antimicrobiano**, con la posterior observación de células de zonas con concentraciones subinhibitorias, o por **colocación de membranas con microorganismos** sobre placas de agar con concentraciones sub-CMI.

Estos últimos métodos son los más utilizados tanto por su simplicidad como por su buena reproducibilidad. Además el crecimiento de microorganismos en fase sólida o semisólida como el agar reproduce mejor las condiciones que se pueden encontrar en una infección "in vivo" (132).

Muchos grupos de antimicrobianos inducen cambios en la forma de las bacterias. Las quinolonas inducen la formación de filamentos en bacterias Gram-negativas (50, 130), aunque el mecanismo de acción no está suficientemente estudiado. Algunos macrólidos parecen inhibir la separación de células en *S. aureus*, aunque los septos son de 2 a 3 veces más finos que con β -lactámicos (132). Sin embargo, el grupo mejor y más estudiado es el de los β -lactámicos, que alteran de forma más significativa la forma de los microorganismos (22, 45, 95, 96, 97, 100). Su acción sobre la morfología de las bacterias es grande debido a su mecanismo de acción. Producen filamentación o formación de esferoplastos en bacterias Gram-negativas, según sobre que PBP tenga más afinidad el antimicrobiano:

- PBPs 1a y 1b: esferoplastos con lisis celular rápida.
- PBP 2: esferoplastos sin lisis celular.
- PBP 3: filamentos sin septo.

En las bacterias Gram-positivas, la morfología más comúnmente encontrada es la de formas anormalmente grandes con hasta 32 células que no se han separado, denominadas en inglés "**clusters**". Tanto los "**clusters**" como los filamentos o esferoplastos se han observado también "**in vivo**" (132).

La importancia de estos cambios morfológicos es grande, ya que está fuertemente relacionada con la fagocitosis por parte de células del sistema inmune, como polimorfonucleares. Algunos autores han observado que estafilococos expuestos a penicilina son fagocitados más rápidamente que controles (128). En el caso de Gram-negativos, filamentos de *E. coli* o *P. aeruginosa* son matados más fácilmente que una misma masa de bacilos separados (126).

2.2.2. Efectos sobre el crecimiento de cultivos de bacterias

Los efectos de las concentraciones subinhibitorias sobre el crecimiento de los microorganismos es un tema de la máxima actualidad. Estas concentraciones, sin embargo, actúan de distinta manera sobre las bacterias en fase de crecimiento logarítmico, fase estacionaria o microorganismos previamente expuestos a la acción del antimicrobiano. Esta diferencia ha llevado a la definición de dos términos que definen estas circunstancias: el efecto de las concentraciones subinhibitorias (ECS) y el efecto de sub-CMI sobre bacterias en fase de EPA (ECS EPA) (157, 158, 159, 160). Estos efectos han sido estudiados en un buen número de antimicrobianos y se ha demostrado que el segundo es significativamente más largo. Neumococos y estafilococos preexpuestos a penicilina o benzilpenicilina, aspoxicilina, teicoplanina, esparfloxacino, vancomicina o roxitromicina han tenido un mayor retraso en el crecimiento (un mayor EPA) cuando eran expuestos a concentraciones sub-CMI de estos antimicrobianos que cultivos no preexpuestos (155, 157, 159, 161). Este mayor ECS EPA que ECS parece estar relacionado con la presencia o no de EPA, ya que antimicrobianos sin efecto postantibiótico no lo inducen (ampicilina, piperacilina sobre Gram-negativos)(160).

Algunos estudios "**in vivo**" parecen apoyar los resultados "**in vitro**". Fluckiger y cols (66) demostraron este efecto con imipenem y *P. aeruginosa*, con un ECS EPA de varias horas. Este efecto es importante "**in vivo**" porque siempre se encuentran concentraciones subinhibitorias tras la administración de un antimicrobiano, lo que podría alargar un posible EPA.

2.2.3. Otros efectos sobre las bacterias

Algunos ejemplos de otros efectos que las concentraciones sub-CMI producen en las bacterias son:

- **Efectos sobre la adhesión a superficies:** algunos estudios han demostrado una disminución significativa de la adherencia de *P. aeruginosa* o *E. coli* al ser tratado con sub-CMI de ciprofloxacino, enoxacino o gentamicina (27, 211). Otros antimicrobianos como imipenem, tobramicina, metilicina o cefalotina tuvieron también efectos sobre la adhesión (181).

- **Efectos sobre la actividad del suero y fagocitos (2):** cepas de *E. coli* y *S. aureus* (resistentes al suero) han demostrado una mayor sensibilidad al éste después de ser tratadas con sub-CMI de algunos antimicrobianos (1, 189). Por otro lado, algunos antimicrobianos como azitromicina, roxitromicina, cefamandol o gentamicina han incrementado el poder de fagocitosis de bacterias opsonizadas por los PMNs humanos (3, 163).

- **Efectos sobre la producción de factores de virulencia:** se ha observado la supresión por parte de eritromicina en concentraciones sub-CMI de la producción "in vitro" de exotoxina A, elastasa y fosforilasa de *P. aeruginosa* (104). Cepas con cápsula mucosa y no mucosa de esta misma especie han sido expuestas a la acción de sub-CMI de aminoglicósidos, β -lactámicos y ciprofloxacino, observándose en los primeros una reducción de la excreción de la cápsula de alginato y de sideróforos quelantes de acero (150).

Todos estos parámetros, al igual que los anteriores y el EPA, influyen en la relación antimicrobiano-parásito de manera muy importante como para que su estudio conjunto sea llevado a cabo en el caso de antimicrobianos en uso y nuevas sustancias de interés en la microbiología clínica y la quimioterapia.

II. Justificación y Objetivos

Las nuevas investigaciones que se han llevado a cabo en el estudio de ciertos factores farmacodinámicos en las últimas décadas han conseguido que se cambie en cierta manera la forma de ver la relación microorganismo-huésped-antimicrobiano. El EPA y los efectos de concentraciones subinhibitorias son dos importantes factores que hoy muchos clínicos pueden tener en cuenta al administrar un antimicrobiano a un paciente.

Sin embargo, estos parámetros pueden variar mucho más que los farmacocinéticos, ya que sobre ellos actúan muchos más factores (incluida la propia farmacocinética). Tanto los microorganismos como el estado de los pacientes pueden hacer variar de forma substancial estos factores, por lo que su estudio debe abarcar un número muy grande de situaciones que se pueden dar en la realidad "in vivo".

Por otro lado, estos estudios "in vivo" son necesarios para una mejor aproximación a lo que ocurre en el hombre. Los modelos animales dan resultados que serían difíciles de obtener en ensayos con humanos, ya por ética o por dificultades técnicas. No quiere decir esto que los ensayos "in vitro" no sean necesarios, sino que son una primera aproximación imprescindible cuando determinadas sustancias no se conocen en profundidad.

La necesidad de incluir el estudio de estos factores farmacodinámicos en la investigación de nuevas sustancias antimicrobianas, así como de otras ampliamente utilizadas hoy en día, nos lleva a proponer los siguientes objetivos para este trabajo:

1) Estudiar "in vitro" el efecto postantibiótico (EPA) de meropenem y ciprofloxacino frente a *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* mediante el método de dilución; así mismo, estudiar los efectos de concentraciones sub-CMI en el crecimiento y en la morfología bacteriana de *S. aureus* y *E. coli* mediante técnicas estándar.

2) Mediante el modelo de infección en muslo de ratón neutropénico, estudiar el EPA "in vivo" de estos mismos antimicrobianos frente a las tres cepas citadas en el punto anterior, así como realizar curvas de letalidad "in vivo" con diferentes dosificaciones frente a *S. aureus* y *E. coli*.

3) Con el modelo "in vivo" de infección intraperitoneal, observar los cambios morfológicos que estos antimicrobianos inducen en *S. aureus* y *E. coli* tras un tratamiento corto.

4) Por último, evaluar cada uno de estos efectos por separado y su posible implicación en los regímenes de dosificación de meropenem y ciprofloxacino, comparando en primer

lugar los datos "in vitro" e "in vivo" y las diferencias entre las dos sustancias.

III. Materiales y Métodos

1. MATERIALES

Los materiales utilizados fueron los siguientes:

1.1. MICROORGANISMOS

Las cepas utilizadas tanto en los experimentos "in vitro" como "in vivo" fueron:

- *Escherichia coli* ATCC 25922.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Las cepas se conservaron en placas de agar de M-H a 0°C, llevándose a cabo resiembras en medio fresco cada 5-6 días. En el día del experimento se inocularon en caldo o agar de M-H, dependiendo del tipo de trabajo, incubándose a 37 °C durante 16-18 horas.

1.2. ANTIMICROBIANOS

Los antimicrobianos utilizados en todos los ensayos fueron ciprofloxacino y meropenem, suministrados por Bayer S.A. e ICI-Farma S.A. respectivamente, en forma de polvo valorado con una potencia de 86,2% y 84,6%. Los stocks fueron preparados de acuerdo con las instrucciones del laboratorio farmacéutico, y se separaron en alícuotas de 1 ml cada una, conservándolas a -18 °C hasta su utilización. Para cada ensayo se utilizó una alícuota que se diluyó en agua destilada o solución salina estéril hasta conseguir la concentración requerida.

1.3. ANIMALES

Se utilizaron ratones hembras BALB/C (suministrados por PANLAB S.A. y que pertenecían al animalario del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina), de peso 25-27 g. y edad entre 18-20 semanas. Los animales se mantuvieron con aporte de comida y agua "ad libitum" y a temperatura constante, vigilando que no presentaran patología alguna.

1.4. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios utilizados fueron los siguientes:

- Caldo de Müller-Hinton (OXOID)
- Agar de Müller-Hinton (OXOID)
- Agar Iso-sensitest (OXOID)

Estos medios fueron preparados según las instrucciones del fabricante.

1.5. OTROS PRODUCTOS Y REACTIVOS

- Solución salina (9 g de ClNa (PANREAC) en 1 L de agua destilada).
- Solución PBS (Buffer Fosfato Salino): polvo preparado (Biomérieux) para diluir en agua destilada, con un pH de 7,2.
- Ciclofosfamida (Genoxal, de Laboratorios FUNK) en viales de 200 mg con 10 ml de agua destilada.
- Discos de 1/2 pulgada (DIFCO).
- Eter anestésico (PANREAC).
- Metanol (PANREAC).
- Arena de mar estéril (PANREAC).
- Talco (disuelto en agua destilada y esterilizado).

1.6. INSTRUMENTAL

Los aparatos e instrumentos utilizados eran los disponibles en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina:

- Estufas Heraeus
- Hornos Heraeus
- Autoclave (Selecta Mod. Cino-Matic); la esterilización se llevó a cabo en un tiempo de 20 minutos a 121 °C (1.2 atm.)
- Baños con agitación (Selecta Unitronic Mod. 320 OR)
- Centrífuga (Selecta Mod. Meditronic)
- Espectrofotómetro (HITACHI Mod. U-1100)
- Microscopio Olympus BH2-RFCA
- Micropipetas (Gibson)
- Vórtex (Heidolph Reux 2000)
- Morteros de porcelana (Comercial Anger)
- Material quirúrgico: tijeras, bisturí, pinzas (Comercial Anger)
- Calibre (Fowler Ultra-Cal II, Sylvac)
- Jeringuillas de insulina (Plastipak, Becton Dickinson).

-
- Placas Petri de 9 y 15 cm de diámetro (Droquima y Soria Greiner).
 - Tubos de vidrio de $10,3 \pm 0,2$ mm. de diámetro (Comercial Anger).

2. METODOS

2.1. ESTUDIOS "IN VITRO"

2.1.1. Recuento de microorganismos

La concentración de microorganismos se calculó mediante la técnica de recuento en placa, descrita por varios autores (112); este método consiste en hacer una dilución seriada del cultivo inicial, obteniendo una serie de tubos que contienen cada uno 10 veces menos concentración que el anterior. A continuación se sembraban 25 μ l de cada tubo en placas de agar M-H, contándose a las 18-24 horas el número de UFC y calculándose entonces la concentración del cultivo inicial. No se tuvieron en cuenta las placas con un número de UFC por debajo de 20 o por encima de 200.

2.1.2. Cálculo de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias y Bactericidas (CMI y CMB)

La técnica empleada fue la de macrodilución en tubo (112), método que consiste en los siguientes pasos:

- primero se prepararon una serie de tubos que contenían 1 ml de caldo M-H más determinadas concentraciones de antimicrobiano. Cada tubo tenía el doble que el siguiente. El tubo con mayor concentración era de 256 μ g/ml y el de menor, de 0,0075 μ g/ml. El tubo control contenía 1 ml de medio M-H sin antimicrobiano.
- en segundo lugar se añadió a cada tubo 1 ml de inóculo. Este se preparó ajustando la turbidez de un tubo con solución salina y microorganismos en fase logarítmica de crecimiento al tubo n° 1 de la escala de Mc. Farland (3×10^8 UFC/ml) y diluyendo después hasta conseguir una concentración de 10^5 UFC/ml en caldo M-H.

La CMI se calculó, transcurridas 18-24 horas en estufa a 37°C, como la concentración del primer tubo que no presentaba crecimiento (turbidez) en comparación con el tubo control.

Para el cálculo de la CMB, se sembraron en placas con agar de M-H unos 10 μ l del contenido de 6 tubos por encima al de la CMI, incubándose 18-24 horas en estufa a 37 °C. Se tomó el valor de la CMB como la concentración del tubo que había destruido el 99.9% de los microorganismos.

Este proceso se hizo por triplicado para los dos antimicrobianos (ciprofloxacino y meropenem) con las tres cepas (*E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*).

2.1.3. Efecto postantibiótico (EPA)

La cuantificación del EPA se realizó en un cultivo de microorganismos que se expusieron a la acción del antimicrobiano durante 1 hora, y comparando después el crecimiento con un cultivo control (39). En el caso de meropenem, *S. aureus* también se expuso durante un tiempo de 2 horas.

Los cultivos contenían 50 ml de caldo M-H al que se le añadieron microorganismos (en fase logarítmica) alcanzándose una concentración de 10^7 UFC/ml (absorbancia de 0.06 a 580 nm). Las concentraciones de antimicrobiano que se añadieron fueron las siguientes:

- meropenem: 0,3 mg/l para *E. coli*, 0,6 mg/l para *S. aureus* y 20 mg/l para *P. aeruginosa*.
- ciprofloxacino: 0,5 mg/l para *E. coli*, 6 mg/l para *S. aureus* y 2,5 mg/l para *P. aeruginosa*.

Para cada concentración y microorganismo se mantuvo un matraz como control. Todos los matraces se incubaron a 37 °C en baño con agitación durante 1 hora (en el caso de meropenem y *S. aureus* también se dejaron 2 h.), al cabo de la cual se procedió a retirar el antimicrobiano mediante la técnica de dilución (39). Para ello se tomaron 50 µl de cada matraz (control y tratados) añadiéndoselos a 50 ml de caldo M-H (dilución 1:1000), con lo que el efecto del antimicrobiano quedaba anulado. Los matraces se incubaron entonces 7 horas de nuevo a 37°C en baño con agitación.

Las curvas de EPA se elaboraron a partir de recuentos bacterianos que se hicieron cada hora desde el tiempo 0 (adición del antimicrobiano) hasta la 7ª hora. Este proceso se repitió tres veces con cada antimicrobiano y cada microorganismo.

El cálculo de la duración del EPA se efectuó utilizando la fórmula descrita por Mc. Donald (143):

$$\text{EPA} = T - C$$

donde:

- T = tiempo (en horas) que tarda el cultivo de microorganismos tratados en incrementar 1 logaritmo₁₀ su concentración a partir del tiempo 0 (dilución del antimicrobiano).

- C = tiempo (en horas) que tarda el cultivo control en incrementar 1 logaritmo₁₀ su concentración a partir del tiempo 0.

La duración del EPA se tomó como la media de los tres experimentos \pm el error estándar, considerándose significativo si era mayor de 30 minutos (39, 143).

2.1.4. Efecto Bactericida

Se utilizaron las curvas de EPA para su realización. El efecto bactericida o máxima muerte bacteriana se calculó como la diferencia, en log₁₀, entre el cultivo control y el que contenía antimicrobiano, tomada en la hora 1 (dilución del antimicrobiano) (168).

2.1.5. Efecto "in vitro" de las sub-CMI sobre la recuperación de microorganismos en fase de EPA

El efecto de las sub-CMI de meropenem y ciprofloxacino se realizó sobre *E. coli* y *S. aureus* de la siguiente manera (157, 158, 159, 160): cultivos en fase logarítmica de estos dos microorganismos fueron pre-expuestos a la acción de meropenem y ciprofloxacino durante los tiempos y concentraciones que se indican:

- meropenem: una hora a una concentración de 0,6 mg/l tanto para *E. coli* como *S. aureus*.

- ciprofloxacino: una hora a una concentración de 0,5 mg/l para *E. coli*, y 1,5 horas y 4 mg/l para *S. aureus*.

Estas concentraciones fueron las mismas que se utilizaron en los experimentos de EPA "in vivo", pero los tiempos de pre-exposición se modificaron en el caso de ciprofloxacino debido a su alto poder bactericida, sobre todo con *E. coli*.

Después de esta pre-exposición se eliminó el antibiótico mediante centrifugación (10 min. x 2000 g) y posterior eliminación del sobrenadante, añadiendo medio M-H fresco para reuspender las bacterias. Este cultivo se dividió en 5 alícuotas, permaneciendo una de ellas como control. En cada una de las 4 alícuotas restantes se procedió a añadir las

concentraciones de antimicrobiano necesarias para alcanzar $1/8 \times \text{CMI}$, $1/4 \times \text{CMI}$, $1/2 \times \text{CMI}$ y $1 \times \text{CMI}$. Estas cantidades fueron:

- meropenem y *E. coli*: 0,03 mg/l (CMI), 0,015 mg/l ($1/2 \times \text{CMI}$), 0,0075 mg/l ($1/4 \times \text{CMI}$) y 0,00375 mg/l ($1/8 \times \text{CMI}$).
- meropenem y *S. aureus*: 0,06 mg/l (CMI), 0,03 mg/l ($1/2 \times \text{CMI}$), 0,015 mg/l ($1/4 \times \text{CMI}$) y 0,0075 mg/l ($1/8 \times \text{CMI}$).
- ciprofloxacino y *E. coli*: 0,015 mg/l (CMI), 0,0075 mg/l ($1/2 \times \text{CMI}$), 0,00375 mg/l ($1/4 \times \text{CMI}$) y 0,001875 mg/l ($1/8 \times \text{CMI}$).
- ciprofloxacino y *S. aureus*: 0,5 mg/l (CMI), 0,25 mg/l ($1/2 \times \text{CMI}$), 0,125 mg/l ($1/4 \times \text{CMI}$) y 0,0625 mg/l ($1/8 \times \text{CMI}$).

Durante las 7 horas siguientes se mantuvieron los cultivos en baño a 37°C y con agitación, haciéndose recuento bacteriano cada hora a partir de la eliminación del antibiótico. Este proceso se hizo por duplicado para cada antimicrobiano y microorganismo.

2.1.6. Efecto "in vitro" de las sub-CMI sobre la morfología de microorganismos en fase logarítmica

Este ensayo se llevó a cabo exponiendo microorganismos en fase logarítmica a la acción de concentraciones de meropenem y ciprofloxacino iguales e inferiores a la CMI. Los microorganismos utilizados fueron *E. coli* y *S. aureus*.

La exposición se llevó a cabo mediante la técnica de membranas en placa (130, 131, 132), que se describe a continuación: discos de 12 mm de diámetro aproximado y sin antimicrobiano se colocaron sobre placas de agar de M-H y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para que se impregnaran. Seguidamente se inocularon 0,1 ml de un cultivo de 24 h. (diluido convenientemente hasta 10^7 UFC/ml) sobre los discos, y se incubaron durante 2 h. a 37°C para alcanzar crecimiento logarítmico.

Pasado este tiempo se traspasaron los discos a placas con M-H que contenían concentraciones de antimicrobiano de CMI, $1/2 \times \text{CMI}$ y $1/4 \times \text{CMI}$ de meropenem o ciprofloxacino, incubando de nuevo durante 4 h. a 37°C . Por último, cada membrana se colocó sobre dos portas, apretando ligeramente con el mango de una lanceta. Los portas se tiñieron mediante la tinción Gram y se observaron la microscópio, midiendo la longitud de los bacilos o filamentos y el diámetro de los cocos, tomando como valores los siguientes:

- para *S. aureus* se tomó como valor normal de diámetro 1 μm , considerándose por encima de éste como forma anormal (agregado celular) (81, 130).
- para *E. coli*, el valor de longitud normal del bacilo se estableció entre 1-3 μm (87, 130), considerándose entre 4 y 10 μm como bacilos elongados y mayor de 10 μm como filamento (corto 10-20 μm y largo $> 30 \mu\text{m}$). Este valor se tomó como límite ya que es el doble de la longitud del bacilo en la división media (5 μm)(130).

En cada porta se contaron 8 campos con al menos 100 células en cada uno, calculándose los porcentajes de cada tipo de morfología. Se sacaron fotografías de cada uno de los portas.

2.2. ESTUDIOS "IN VIVO"

Tanto para el estudio del EPA como las curvas de letalidad "in vivo", se utilizó el modelo de infección en muslo de ratón neutropénico, descrito por varios autores (39, 89, 90, 91, 92, 198).

2.2.1. Efecto Postantibiótico

Para la realización de este ensayo, según el método descrito por Vogelmann y cols. (198), se llevaron a cabo (por duplicado) los siguientes pasos:

A) Inmunodepresión

Los ratones se inmunodeprimieron con las dosis de 150 y 100 mg/kg de ciclofosfamida (vía intraperitoneal) en los días 0 y 3 respectivamente.

Previamente a la aplicación de este modelo se había comprobado la eficacia de la ciclofosfamida como inmunodepresor en el ratón, al alcanzar un porcentaje de reducción de leucocitos del 70-84% en el día del experimento del EPA (día 4), lo que permite prácticamente anular el sistema inmunológico y evitar una posible interferencia en la infección bacteriana (138).

B) Infección en el muslo

La infección en el muslo se hizo por vía intramuscular, inyectando un volumen de 0,1 ml de caldo M-H con microorganismos en fase de crecimiento exponencial (*E. coli*, *S. aureus*

o *P. aeruginosa*); el número total de UFC inyectado fué de 10^6 - 10^7 UFC/ml. Los inóculos iniciales de todos los experimentos fueron comprobados mediante espectrofotometría, correspondiendo un 85-90 % de transmitancia (longitud de onda de 580 nm) con una concentración de 10^6 - 10^7 UFC/ml.

El número de ratones infectados fue de 45, siendo cada uno infectado en los dos muslos por la misma bacteria.

Este tiempo se tomó como el T_2 .

C) Tratamiento antimicrobiano

Al cabo de 2 horas de la infección en el muslo, los ratones fueron separados en 2 grupos:

- tratados: a 27 ratones se les inyectó por vía subcutánea en el muslo un volumen de 0,2 ml de solución salina y antimicrobiano con las siguientes concentraciones:

- **meropenem**: 0,6 mg/kg en el caso de *E. coli* y de *S. aureus*, y 20 mg/kg para *P. aeruginosa*.
- **ciprofloxacino**: 0,5 mg/kg para *E. coli* y 4 mg/kg para *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

La elección de estas dosificaciones se hizo teniendo en cuenta las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del antimicrobiano, así como su poder bactericida "in vitro".

- controles: 18 ratones a los que se les inyectó un volumen igual (0,2 ml) de solución salina.

Este punto se tomó como tiempo 0 del experimento.

D) Sacrificio de los animales y extracción de los muslos

Se sacrificaron 3 ratones (por dislocación cervical bajo anestesia) por cada tiempo que se indica a continuación:

- grupo Control: en las horas 0 (administración del antimicrobiano), 2, 4, 6, 8 y 10.
- grupo de Tratados: desde la 1ª hasta la 10ª hora.

Después del sacrificio de cada animal y con ayuda de material quirúrgico (pinzas, bisturí y tijeras) se extrajeron los muslos del ratón, separando la piel y cortando el músculo en pequeños trozos que se llevaron a un mortero de porcelana estéril, añadiéndole 9 ml de solución salina (dilución 1:10 del número de bacterias en el muslo) y homogenizando durante 3-5 minutos con arena de mar estéril; a continuación se tomó el sobrenadante del mortero y se procedió al recuento de microorganismos.

E) Recuento del número de UFC en el muslo del ratón

A partir del homogeneizado (que se consideró como dilución 1:10 del número real de UFC en el muslo) se procedió a realizar el recuento de UFC por el método (ya descrito en los estudios "in vitro") de banco de diluciones y recuento en placa. Se obtuvieron así las concentraciones de microorganismos en los distintos tiempos y se elaboró una gráfica con los datos.

F) Cálculo del tiempo en el que los niveles séricos de antimicrobiano están sobre la CMI y otros parámetros farmacocinéticos.

Los niveles de antimicrobiano en suero se determinaron por la técnica de bioensayo, utilizándose el método de difusión en agar de Grove y Randall (85), ligeramente modificado y adaptado a nuestras necesidades. Los pasos fueron los siguientes:

- elaboración de la recta estandar: se utilizaron placas Petri de 15 cm de diámetro con 70 ml de agar Iso-Sensitest y un microorganismo patrón sembrado en masa con una concentración de 10^5 - 10^6 UFC/ml. En nuestro caso la cepa patrón fue *Escherichia coli* ATCC 25922. Una vez solidificado el agar, se procedió a hacer pocillos (3-4 por placa) de 10.3 ± 0.2 mm de diámetro con la boca de un tubo de vidrio unido a un aparato succionador, que extraía el agar. Todo ello fue realizado de la manera más estéril posible. Cada pocillo fue rellenado con 300 μ l de una solución de PBS y antibiótico a distintas concentraciones, realizándose el ensayo por triplicado. Las concentraciones de antimicrobiano fueron:

- meropenem: concentraciones al duplo desde 0,0015 hasta 128 mg/l.
- ciprofloxacino: concentraciones al duplo desde 0,00075 hasta 128 mg/l.

Para cada recta estándar se realizaron pocillos control con 300 μ l de solución PBS.

Se incubaron las placas a 37°C y, transcurridas 24 horas, se midieron los halos de inhibición con un calibre, realizándose con los datos una regresión lineal y una recta de mínimos cuadrados (recta estándar) que relacionaba el logaritmo de la carga y el diámetro del halo en milímetros.

- Cálculo de las concentraciones de antimicrobiano en las muestras de suero de ratones neutropénicos: las muestras de suero se obtuvieron por centrifugación (3500 rpm durante 10 minutos) de sangre de ratones neutropénicos extraída por el seno retroorbital. Los ratones fueron tratados con las mismas dosis que en el apartado de tratamiento antimicrobiano.

La obtención de sangre se realizó a partir de la administración del antimicrobiano y durante 4 horas; la 1ª media hora cada 15 minutos y posteriormente cada 30 minutos hasta la 4ª. Se utilizaron 3 ratones por cada tiempo de extracción de sangre, haciendo un total de 30 ratones por cada ensayo de antimicrobiano-microorganismo (3 controles sin antimicrobiano y 27 tratados).

Una vez obtenidos los sueros se procedió a llenar, por cada tiempo de extracción, 3-4 pocillos en placas Petri preparadas de igual forma que la explicada para la recta estándar. Tras una incubación a 37°C durante 24 horas, se midieron los halos de inhibición y se calculó la concentración de antimicrobiano correspondiente mediante la recta estándar y la ecuación de regresión lineal. Con estos datos se preparó una gráfica de niveles de concentración de antimicrobiano en suero (mg/l) frente al tiempo (h.) por cada antimicrobiano y dosis.

El cálculo del tiempo en el que los niveles de antimicrobiano superan a la CMI se realizó interpolando la CMI en los datos obtenidos en los tiempos de extracción del suero. Además se calcularon mediante ordenador (una subrutina en lenguaje BASIC) la concentración máxima, el tiempo de concentración máxima, la vida media y el área bajo la curva de concentración frente al tiempo (A.B.C.).

G) Cálculo del EPA

Una vez obtenido el tiempo que el antimicrobiano superó la CMI en suero, se calculó el tiempo de efecto postantibiótico mediante la fórmula (168):

$$\text{EPA} = T - C$$

donde:

- **T** = tiempo necesario para que el número de UFC en los muslos de ratones tratados aumenten 1 logaritmo₁₀ su concentración a partir del tiempo en que los niveles de antimicrobiano en suero descienden de la CMI.
- **C** = tiempo necesario para que el número de UFC en los muslos de ratones controles aumenten 1 logaritmo₁₀ su concentración a partir del tiempo 0.

Se consideró EPA significativo si era mayor de 30 minutos.

2.2.2. Control de las concentraciones subinhibitorias y residuales del antimicrobiano en el muslo

Para demostrar que el retraso en el crecimiento bacteriano no se debía a la acción de antimicrobiano residual (sub-CMI, metabolitos, etc.) se procedió a infectar el muslo de ratones inmunodeprimidos con microorganismos en fase logarítmica de crecimiento, justo en el momento en que los niveles de antimicrobiano en suero descendieron de la CMI (198).

El método fue el siguiente: se inmunodeprimieron grupos de 36 ratones. En el día del experimento se les administró a la mitad de los ratones (tratados) por vía subcutánea, una dosis de antimicrobiano igual que la utilizada en la evaluación del EPA, mientras que al otro grupo (control, 18 ratones) se les inyectó el mismo volumen de solución salina. Al cabo del tiempo en que los niveles de antimicrobiano en suero excedían la CMI, se infectaron todos los muslos de los ratones con 0,1 ml de caldo M-H con 10^6 - 10^7 UFC de *S. aureus*, *E. coli* o *P. aeruginosa* en fase logarítmica de crecimiento.

Se sacrificaron 3 ratones cada hora desde la 1ª (la infección en el muslo es a las 0 horas) hasta la 6ª, se extrajeron los muslos y se procedió al recuento bacteriano en cada cada homogenizado, elaborándose una gráfica con los datos de log₁₀ UFC/muslo frente al tiempo (h.).

2.2.3. Efecto bactericida

El efecto bactericida, al igual que en los experimentos "in vitro", se calculó como la diferencia de crecimiento en log₁₀ entre el número de UFC de los controles y los ratones tratados, tomada en el tiempo en que los niveles de antimicrobiano descienden de la CMI (168).

2.2.4. Curvas de letalidad

En la evaluación de la actividad "in vivo" de los dos antimicrobianos (meropenem y ciprofloxacino) se utilizó la misma técnica que en el estudio del EPA "in vivo": infección en muslo de ratón neutropénico (198). Las cepas utilizadas fueron *E. coli* y *S. aureus*. Las dosificaciones fueron distintas en cada uno de los antimicrobianos.

A) Ciprofloxacino: se utilizaron dos pautas de dosificación distintas: una en la cual el antimicrobiano se administraba cada vez que los niveles en suero descendían de la CMI (tipo A), y otra en la que la administración tenía en cuenta este mismo tiempo más el de EPA (tipo B). Para ello se inmunodeprimieron 78 ratones a los cuales se les inyectó en el tiempo -2 del día del experimento y en cada muslo un volumen de 0,1 ml de caldo M-H que contenía 10^6 - 10^7 UFC de *E. coli* o *S. aureus* en fase de crecimiento exponencial. Dos horas después (tiempo 0), los ratones se dividieron en los siguientes grupos:

- tratamiento tipo A (30 ratones): en el ensayo con *E. coli* se les inyectó (vía subcutánea en el muslo) cada 2,5 horas, 0,2 ml de solución salina con una concentración de 0,5 mg/kg; con *S. aureus* la dosis fue de 4 mg/kg cada 2 h. El coste total de antimicrobiano por ratón fue de 2 mg/kg para *E. coli* y 20 mg/kg para *S. aureus*.

- tratamiento tipo B (30 ratones): en el ensayo con *E. coli* sólo se administraron dos únicas inyecciones de 0,5 mg/kg, en los tiempos 0 y 5,5 (tiempo sobre CMI más EPA); con *S. aureus* las dosis fueron 3 de 4 mg/kg en los tiempos 0, 4 y 8 (T > CMI + EPA). El coste total de antimicrobiano por ratón fue de 1 mg/kg para *E. coli* y 12 mg/kg para *S. aureus*.

B) Meropenem: se utilizaron también dos tipos de dosificaciones distintas: una en la cual se administraba una dosis alta cada vez que los niveles en suero descendían de la CMI (tipo A), y otra en la que la dosis era el doble que la anterior durante el doble de tiempo (tipo B). Se inmunodeprimieron 78 ratones, infectando el muslo de la misma forma y con los mismos microorganismos que el apartado anterior (*E. coli* o *S. aureus*). Las dosificaciones en el tiempo 0 fueron las siguientes:

- tratamiento tipo A (30 ratones): en el ensayo con *E. coli* se les inyectó cada 3 horas, 0,2 ml de solución salina con una concentración de 20 mg/kg; con *S. aureus* la dosis fue de la misma (20 mg/kg) cada 2,5 h. Los niveles en suero de antimicrobiano siempre estaban sobre la CMI.

- tratamiento tipo B (30 ratones): en el ensayo con *E. coli* sólo dos únicas inyecciones de 40 mg/kg, en los tiempos 0 y 6; con *S. aureus* las dosis fueron también 2 de 40 mg/kg en los tiempos 0 y 5. En este caso, los niveles en suero de meropenem tenían un pico más alto, pero había un periodo en el que descendían bajo la CMI.

En los dos ensayos se utilizaron controles (18 ratones), a los que se les administró 0,2 ml de solución salina al mismo tiempo que se administraba las dosis en los tratados A y B.

En cada tiempo se sacrificaron 3 ratones por tratamiento y se extrajeron 10 muslos, haciéndose un recuento bacteriano del homogenizado y elaborando una gráfica con los datos de las tres curvas.

2.2.5. Efecto de los dos antimicrobianos sobre la morfología bacteriana.

Para el estudio "in vivo" de la morfología de los microorganismos utilizamos el modelo de infección en la cavidad peritoneal (132, 176, 178) ligeramente modificado, como a continuación se indica. Se inmunodeprimieron 16 ratones a los que en el día del experimento se les inyectó intraperitonealmente 1 ml de solución salina estéril con talco esterilizado más 10^6 - 10^7 UFC de *E. coli* o *S. aureus* en fase de crecimiento exponencial. Después de 2 h. fueron tratados s.c. en el muslo con 0,2 ml de solución salina estéril más una dosis de:

- controles (6 ratones): sin antimicrobiano
- tratados (10 ratones):
 - meropenem: 20 mg/kg tanto con *E. coli* como con *S. aureus*.
 - ciprofloxacino: 0,5 mg/kg en el ensayo con *E. coli* y 4 mg/kg con *S. aureus*.

Estas dosis mantenían los niveles de antimicrobiano en suero sobre la CMI durante:

- meropenem: 3 h. con *E. coli* y 2,5 h. con *S. aureus*.
- ciprofloxacino: 2,4 h. en el ensayo con *E. coli* y 2,1 h. con *S. aureus*.

Al cabo de estos tiempos los ratones fueron sacrificados y se les inyectó 2 ml de solución salina estéril por vía intraperitoneal. Después de un masaje abdominal, se reaspiró la mayor parte del líquido peritoneal con una pipeta Pasteur. Estas muestras se centrifugaron (3500 rpm durante 5 min.) y el sedimento fue extendido en un porta y teñidos mediante la tinción de GRAM.

Estos portaobjetos se examinaron al microscopio, contándose el número de bacilos, filamentos y cocos así como calculando su porcentaje (con los mismos criterios que en el ensayo "in vitro"). También se tomaron fotografías de cada muestra.

2.3. ANALISIS ESTADISTICO

En todos los experimentos se obtuvo la media aritmética y la desviación estándar (109).

Comparación de medias: se realizó mediante el Test de T de Student; la significación estadística se calculó por medio de ordenador (mediante una subrutina en BASIC). Las variables eran independientes y se consideraron iguales las varianzas.

Recta de regresión: se realizó mediante el método de mínimos cuadrados; los datos fueron analizados en ordenador con el programa de cálculo LOTUS 1-2-3 V 3.1+.

IV. Resultados

1. ESTUDIOS "IN VITRO"

1.1. CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS Y BACTERICIDAS (CMI Y CMB)

En la tabla I se muestran las CMI y CMB de los antimicrobianos estudiados frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Ciprofloxacino mostró una CMI más baja frente a las dos cepas Gram-negativas, mientras que *S. aureus* fue más sensible frente a meropenem (0,06 mg/l frente a 0,5 mg/l de ciprofloxacino).

Sólo la CMB de meropenem frente a *E. coli* fue diferente a su CMI (0,06 y 0,03), comprobándose este hecho en las dos repeticiones realizadas. En el resto, el valor de la CMI coincide con la CMB, lo que indica que los antimicrobianos tienen carácter bactericida, menos en el caso antes mencionado.

1.2. EFECTO POSTANTIBIOTICO

El EPA "in vitro" inducido por los dos antimicrobianos frente a las tres cepas se muestran en la tabla II.

Como se puede observar, los EPA de ciprofloxacino tienen valores alrededor de 2 h. frente a *E. coli* y *S. aureus* (2,1 y 2 h.), siendo frente a *P. aeruginosa* de 3,9 h. Sin embargo, en el caso de meropenem, todos los valores se consideraron no significativos excepto en el caso de *E. coli* (0,57 h.), obteniendo incluso valores negativos (-0,3 y -0,83 h. frente a *P. aeruginosa* y *S. aureus*). Sí se obtuvo EPA significativo con 2 horas de exposición frente a *S. aureus* (0,65 h.).

La comparación de medias entre los dos antimicrobianos (en la tabla IV) indica que existen diferencias significativas con una p de 0,01.

1.3. EFECTO BACTERICIDA

Los valores de efecto bactericida de los dos antimicrobianos frente a los tres microorganismos se encuentran también en la tabla II.

También ciprofloxacino muestra los valores más altos frente a las tres cepas ensayadas, siendo todos próximos a $3 \log_{10}$. En el caso de meropenem, el valor más alto se observa frente a *P. aeruginosa* ($1,44 \log_{10}$), no llegando en el resto a $1 \log_{10}$.

1.4. EFECTO "IN VITRO" DE LAS SUB-CMI SOBRE LA RECUPERACION DE MICROORGANISMOS EN FASE DE EPA

En la figura 1 están representadas las curvas de crecimiento de *E. coli* en fase de EPA, tras un tratamiento de 1 hora con meropenem y ciprofloxacino, y el posterior efecto que producen la CMI, $1/2 \times$ CMI, $1/4 \times$ CMI y $1/8 \times$ CMI, sobre estos microorganismos. En la figura 2, se muestran asimismo las curvas frente a *S. aureus*.

En el caso de meropenem (figuras 1A y 2A) se observa que frente a *E. coli* no hay un efecto visible con ninguna de las concentraciones sub-CMI ensayadas; sin embargo, en el caso de *S. aureus*, se aprecia un ligero retraso en el crecimiento con concentraciones de $1/2 \times$ CMI e incluso $1/4 \times$ CMI.

Con ciprofloxacino (figuras 1B y 2B), el efecto de las sub-CMI es sin embargo mucho más apreciable sobre *E. coli* que sobre *S. aureus*: mientras que con $1/8 \times$ CMI se consigue un notable retraso en el crecimiento de *E. coli*, con *S. aureus* sólo se observa con $1/2 \times$ CMI.

En los dos microorganismos se advierte una mayor actividad subinhibitoria de ciprofloxacino, siendo esta más acusada en el caso de *E. coli*.

1.5. EFECTO "IN VITRO" DE LAS SUB-CMI SOBRE LA MORFOLOGIA DE MICROORGANISMOS EN FASE LOGARITMICA

En las figuras 3 y 4 se muestran las fotografías obtenidas tras la exposición "in vitro" de *E. coli* y *S. aureus* a concentraciones iguales e inferiores a la CMI. En las figuras 5 y 6 se pueden observar los porcentajes de cada tipo de morfología sobre el número total de microorganismos contados, en forma de gráfica de barras.

En el caso de *E. coli* (figura 3 y 5) se observa que mientras meropenem (5A) induce la formación de formas cocoides de $1-2 \mu\text{m}$ de diámetro (en mayor número con $1/8 \times$ CMI), ciprofloxacino (5B) hace aumentar de manera significativa los filamentos ($10-20$ y $> 30 \mu\text{m}$) y formas elongadas ($4-10 \mu\text{m}$).

Sobre *S. aureus* (figuras 4 y 6), los efectos de los dos antimicrobianos hacen aumentar el número de formas cocoides mayores de 1 μm o formas anómalas; este efecto es mayor con ciprofloxacino, que lo induce incluso con 1/2 y 1/4 x CMI.

2. RESULTADOS "IN VIVO"

2.1. EFECTO POSTANTIBIOTICO

2.1.1. Tiempo en el que los niveles de antimicrobiano están sobre la CMI y otros parámetros farmacocinéticos.

Los tiempos en el que los antimicrobianos estuvieron en suero sobre la CMI se indican en la tabla III. Estos tiempos se calcularon utilizando las curvas de concentración de antimicrobiano frente al tiempo obtenidas tras interpolar el diámetro del halo en las rectas estándar, como se indicó en el apartado de materiales y métodos.

A) Rectas estándar

Las rectas estándar frente a la cepa patrón *E. coli* ATCC 25922 correspondientes a los dos antimicrobianos (meropenem y ciprofloxacino) se encuentran en la figura 13. Las ecuaciones de regresión lineal basadas en el método de mínimos cuadrados fueron las siguientes:

Ciprofloxacino

$$Y = 11,89 * X + 39,75$$
$$(R^2 = 0,97)$$

Meropenem

$$Y = 8,24 * X + 30,62$$
$$(R^2 = 0,98)$$

donde Y es el diámetro del halo de inhibición y X es el logaritmo de la carga de antimicrobiano.

Según estos resultados se deduce una muy buena correlación lineal entre las dos variables (R^2 muy cercanos a 1), lo que se confirma en las gráficas de la figura 13, que muestran una gran proximidad de la nube de puntos a la recta de mínimos cuadrados.

B) Curvas de concentración de antimicrobiano en suero de raton neutropenico

En las figuras 14 y 15 se muestran las curvas de concentración en suero de ratón neutropénico de meropenem y ciprofloxacino después de dos distintas monodosis.

En la tabla IV están indicados los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos de las curvas de concentración frente al tiempo. En el caso de meropenem (figura 14), las concentraciones máximas se alcanzaron a los 15 minutos y descendieron rápidamente al cabo de 1 hora de la administración del antimicrobiano. Con ciprofloxacino (figura 15), los picos de concentración se alcanzaron en 30 minutos, pero los niveles se mantuvieron detectables durante más tiempo (3-4 h.). La ABC fue dependiente de la dosis, siendo mayor en meropenem con 20 mg/kg, seguido de ciprofloxacino con 4 mg/kg. La vida media fue similar para cada antimicrobiano y dosis (de 0,32 a 0,45 h.), siendo ligeramente menor en el caso de meropenem con la dosis de 0,6 mg/kg.

2.1.2. Duración del EPA

En las figuras 7, 8 y 9 están representadas las curvas de crecimiento de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* (respectivamente) en muslos de ratones tratados y controles, indicándose también el EPA y el tiempo que meropenem y ciprofloxacino están sobre la CMI de estos microorganismos. En la tabla III se resumen los tiempos de EPA junto con las dosis ensayadas.

Los valores de EPA de meropenem no fueron significativos ($> 0,5$ h.) con ninguna de las cepas ensayadas, siendo sobre *S. aureus* donde se alcanza el mayor valor. En el caso de ciprofloxacino los EPA fueron altos, estando los valores entre 1,90 y 3,10 h.. El más largo correspondió a *E. coli*, y el más corto a *S. aureus*.

2.2. CONTROL DE LAS CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS EN EL EPA "IN VIVO"

Las curvas de control de las concentraciones subinhibitorias "in vivo" (figuras 10, 11 y 12) indican que no hay actividad antimicrobiana residual, ya que el crecimiento bacteriano en muslos de ratones controles y que habían sido tratados con meropenem o ciprofloxacino era paralelo.

Este ensayo demuestra que el EPA se debió a un verdadero retraso en el crecimiento de los microorganismos y no a una actividad residual del antimicrobiano.

2.3. EFECTO BACTERICIDA

El efecto bactericida queda resumido en la tabla III, observándose una actividad mayor de ciprofloxacino (alrededor de 2,5 Log₁₀) que de meropenem (alrededor de 1 Log₁₀). Meropenem produjo un mayor efecto sobre *P. aeruginosa*, mientras que ciprofloxacino lo indujo sobre *E. coli*.

2.4. CURVAS DE LETALIDAD

En la figura 16 están representadas las gráficas con los dos tipos de administración de meropenem. Con *E. coli* (A), parece haber una mayor actividad cuando se administran 20 mg/kg cada 3 h., en vez de 40 mg/kg cada 6. Esta diferencia se observa en la tabla V, que muestra el efecto bactericida en la última hora de las curvas, y donde la diferencia es de 1,1 log₁₀. Sin embargo, con *S. aureus* (B) no hay una diferencia significativa entre los dos tipos de tratamientos, lo que se observa en la tabla IV (2,5 y 2,3 Log₁₀).

Las curvas de letalidad de ciprofloxacino se muestran en la figura 17. Tanto el tratamiento tipo A (administración cada vez que los niveles en suero van a descender de la CMI), y tipo B (ese mismo tiempo más el de EPA) tuvieron la misma eficacia y terminaron mostrando valores de efecto bactericida muy similares (tabla V). Sólo en el caso de *S. aureus* (B) parece haber un recrecimiento en las horas 7-8, aunque en la hora 10 las UFC fueron similares. Con el mismo efecto bactericida, el coste de antimicrobiano fue el doble en el tratamiento A que en el B.

También se puede observar en la tabla V el efecto bactericida por hora, que fue más alto frente a *E. coli* con ciprofloxacino, mientras que para *S. aureus* lo fue con meropenem.

2.5. EFECTO DE LOS DOS ANTIMICROBIANOS "IN VIVO" SOBRE LA MORFOLOGIA BACTERIANA

Las figuras 18 y 19 muestran las fotografías de *E. coli* y *S. aureus* (respectivamente) con meropenem y ciprofloxacino. Con *E. coli* frente a meropenem, el porcentaje de formas cocoides es mayor que en controles y ciprofloxacino, según se muestra en la figura 20. Ciprofloxacino, sin embargo, tiene el porcentaje más alto en bacilos de 1-3 µm, por encima del encontrado en el control (50%-50% entre bacilos y cocos).

Con *S. aureus*, las formas cocoides son más irregulares (> 1 µm de diámetro) con

ciprofloxacino que con meropenem, y en este mayores que en el control, como se muestra en la figura 21. Sin embargo, nunca se llegó a sobrepasar el 20% de formas irregulares con ciprofloxacino.

2.6. ANALISIS ESTADISTICO

En la Tabla VI se muestran los resultados de las comparaciones de medias mediante la T de Student para muestras independientes.

Como se puede apreciar, hubo diferencia significativa al comparar el EPA "in vitro" en "in vivo" de ciprofloxacino y meropenem, siendo la media de este último más baja que la de ciprofloxacino. La diferencia en el EPA "in vivo" fue mayor que la del EPA "in vitro" (0,001 frente a 0,01).

No hubo diferencia significativa entre el EPA "in vitro" e "in vivo" de cada antimicrobiano, así como en conjunto.

V. Tablas y figuras

Tabla I. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) de meropenem y ciprofloxacino frente a cepas estándar de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Antimicrobiano	Microorganismo	CMI (mg/l)	CMB (mg/l)
Meropenem	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,03	0,06
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2	2
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,06	0,06
Ciprofloxacino	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,015	0,015
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,25	0,25
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,5	0,5

Tabla II. Concentración ensayada, tiempo de exposición, efecto bactericida y efecto postantibiótico "in vitro" (EPA) de meropenem y ciprofloxacino frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Microorganismo	Antimicrobiano	Conc. (mg/l)	Tiempo exposición (h.)	Efecto bactericida (Log ₁₀ UFC/ml)	EPA (h.)
<i>E. coli</i>	Meropenem	0,3	1	0,62	0,57 ± 0,3
	Ciprofloxacino	0,5	1	3,00	2,1 ± 1,0
<i>P. aeruginosa</i>	Meropenem	20	1	1,44	-0,3 ± 0,8
	Ciprofloxacino	2,5	1	2,60	3,9 ± 0,6
<i>S. aureus</i>	Meropenem	0,6	1	0,59	-0,83 ± 0,7
	"	0,6	2	1,00	0,65 ± 0,4
	Ciprofloxacino	6	1	2,80	2,0 ± 0,6

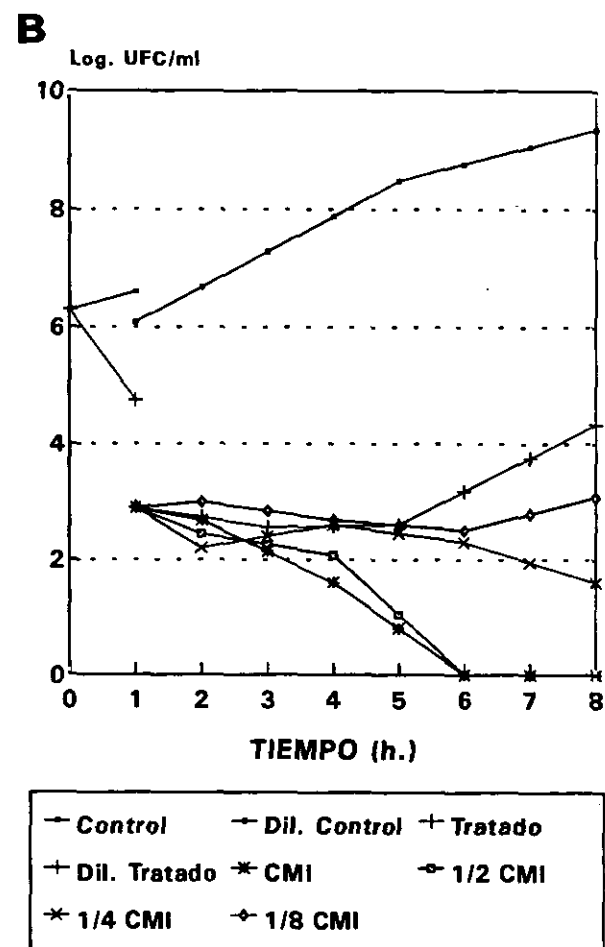
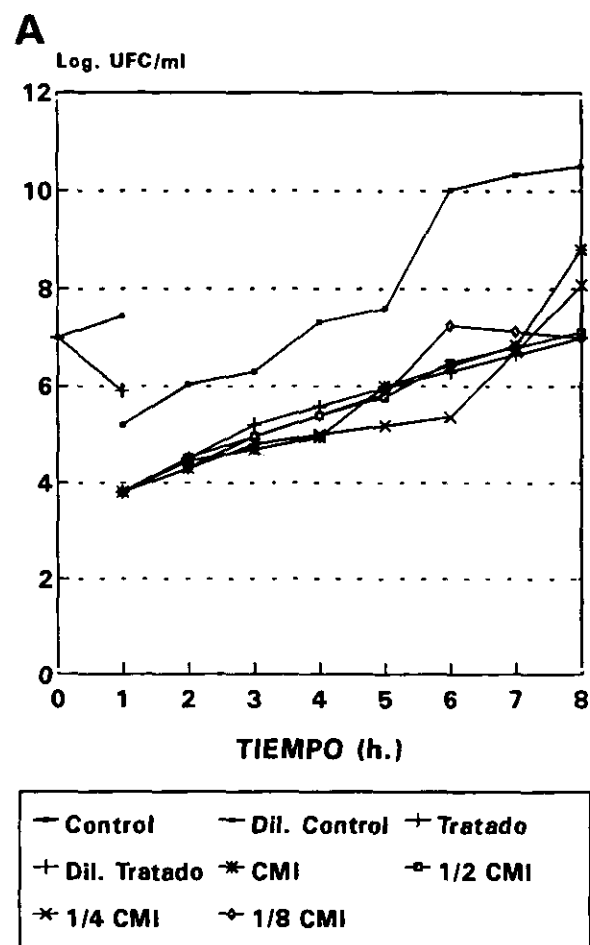


Figura 1. Efecto de concentraciones sub-CMI de meropenem (A) y ciprofloxacin (B) sobre *E. coli* en fase de EPA.

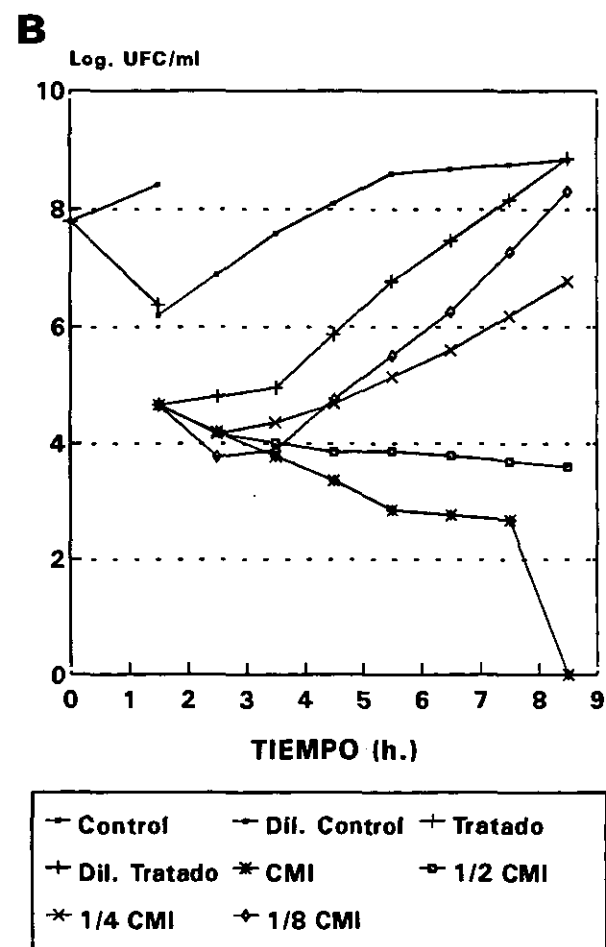
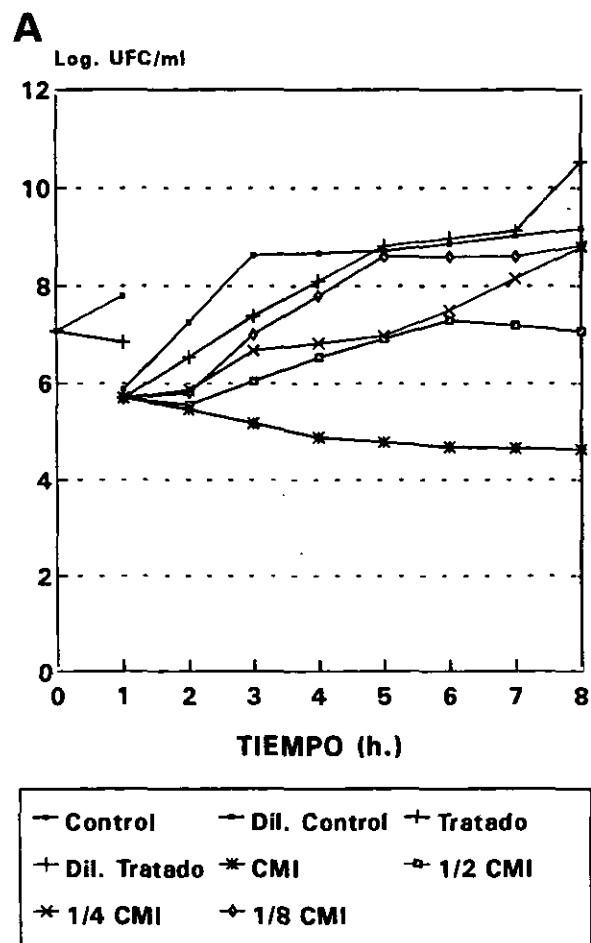


Figura 2. Efecto de concentraciones sub-CMI de meropenem (A) y ciprofloxacino (B) sobre *S. aureus* en fase de EPA.

Tabla III. Tiempo y concentración de preexposición, fracción de CMI añadida y valores de efecto de estas concentraciones sub-CMI (ECS EPA) de meropenem y ciprofloxacino frente a *E. coli* y *S. aureus* en fase de EPA.

Microorganismo	Antimicrobiano	Tiempo preexp. (h)	Conc. preexp. (mg/ml)	Fracción de CMI añadida	ECS EPA (h)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Meropenem	1	0,30	1/2	0,18 ± 0,3
				1/4	0,50 ± 0,4
				1/8	0,29 ± 0,3
	Ciprofloxacino	1	0,5	1/2	> 3,5
				1/4	> 3,5
				1/8	3,06 ± 0,2
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Meropenem	1	0,60	1/2	2,85 ± 0,5
				1/4	1,40 ± 0,4
				1/8	1,14 ± 0,6
	Ciprofloxacino	1,5	4	1/2	> 3,5
				1/4	2,31 ± 0,2
				1/8	1,41 ± 0,3

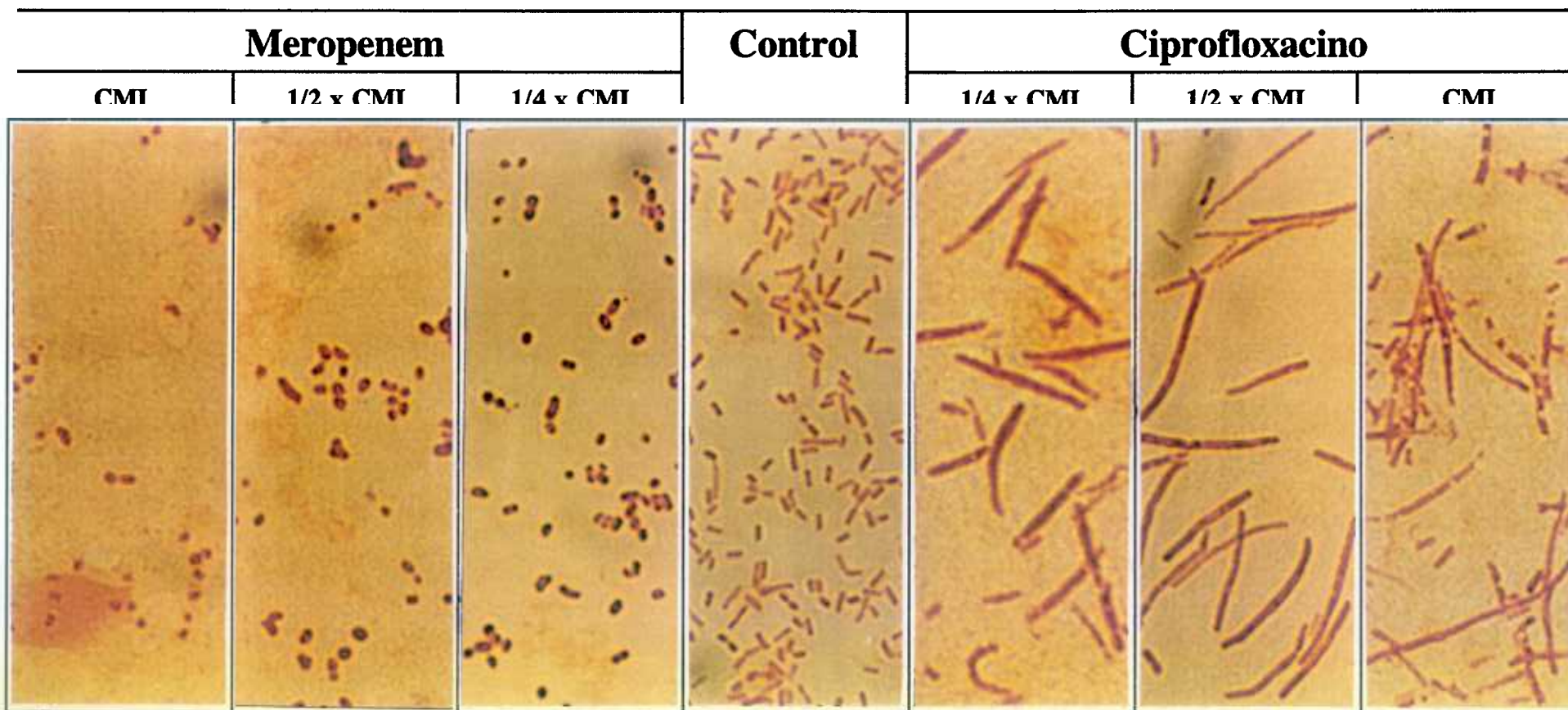
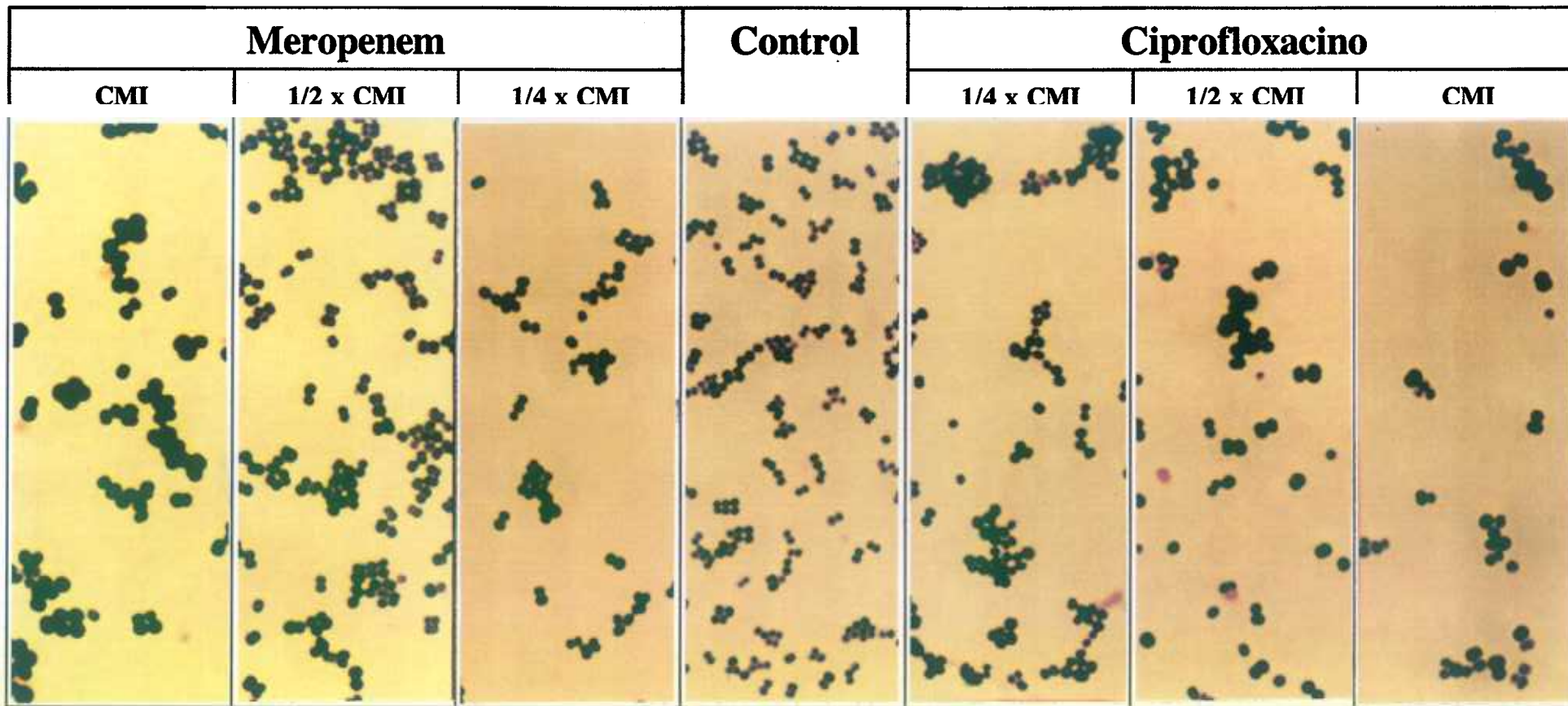


Figura 3. Microfotografías de bacilos de *E. coli* expuestos a la acción "in vitro" de fracciones de la CMI de meropenem y ciprofloxacino.



. **Figura 4.** Microfotografías de cocos de *S. aureus* expuestos a la acción "in vitro" de fracciones de la CMI de meropenem y ciprofloxacin

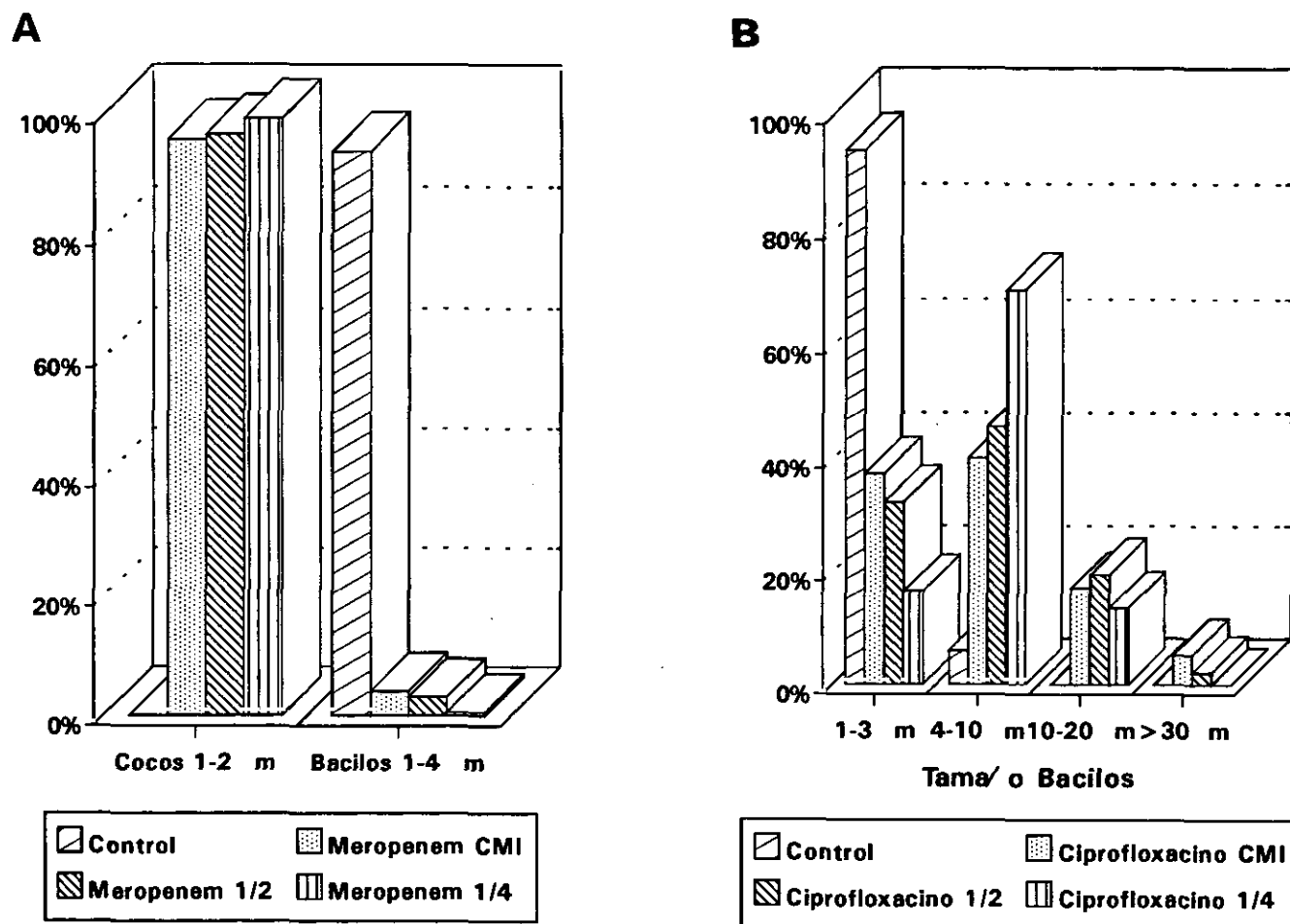


Figura 5. Frecuencia relativa de las distintas morfologías encontradas tras la exposición "in vitro" de *E. coli* a distintas concentraciones sub-CMI de meropenem (A) y ciprofloxacino (B).

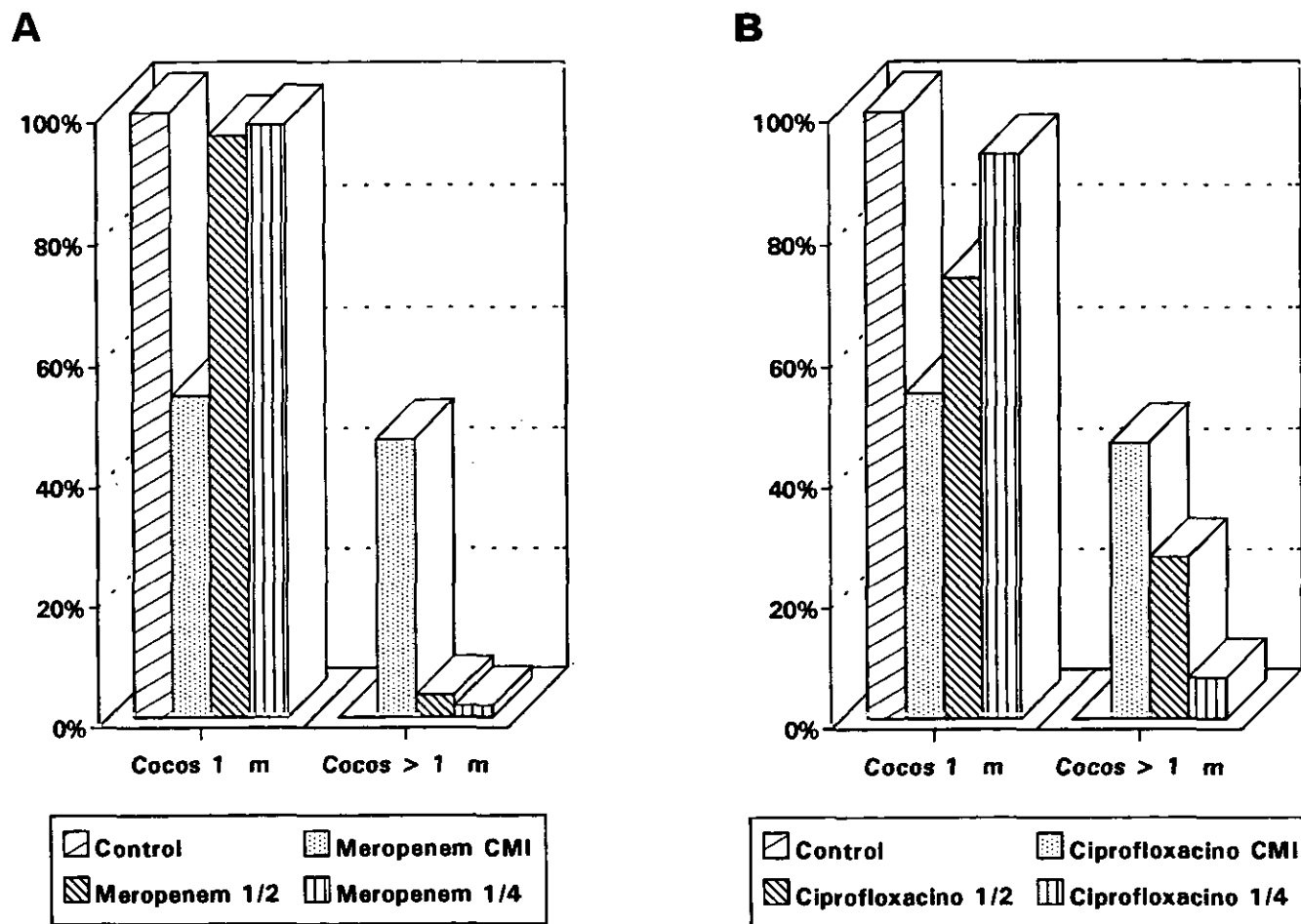


Figura 6. Frecuencia relativa de las distintas morfologías encontradas tras la exposición "in vitro" de *S. aureus* a distintas concentraciones sub-CMI de meropenem (A) y ciprofloxacin (B).

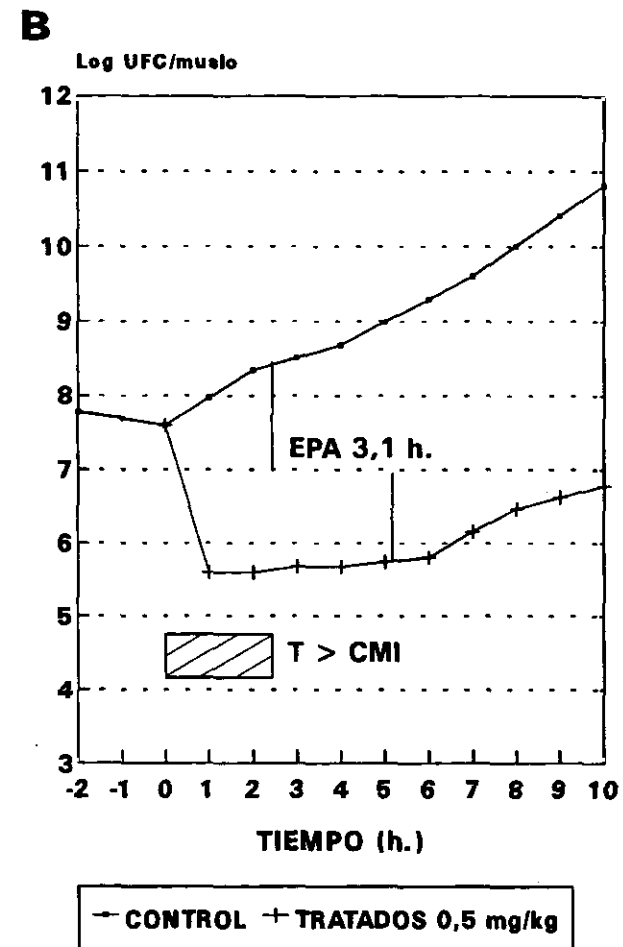
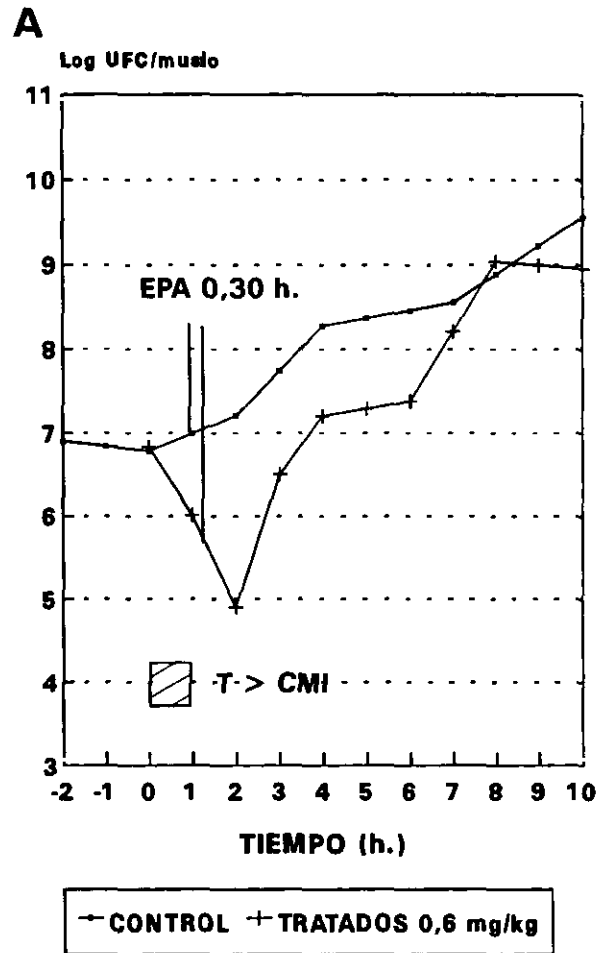


Figura 7. Curvas de efecto postantibiótico (EPA) de meropenem (A) y ciprofloxacino (B) frente a *E. coli*. La barra representa el tiempo que el antimicrobiano estuvo sobre la CMI.

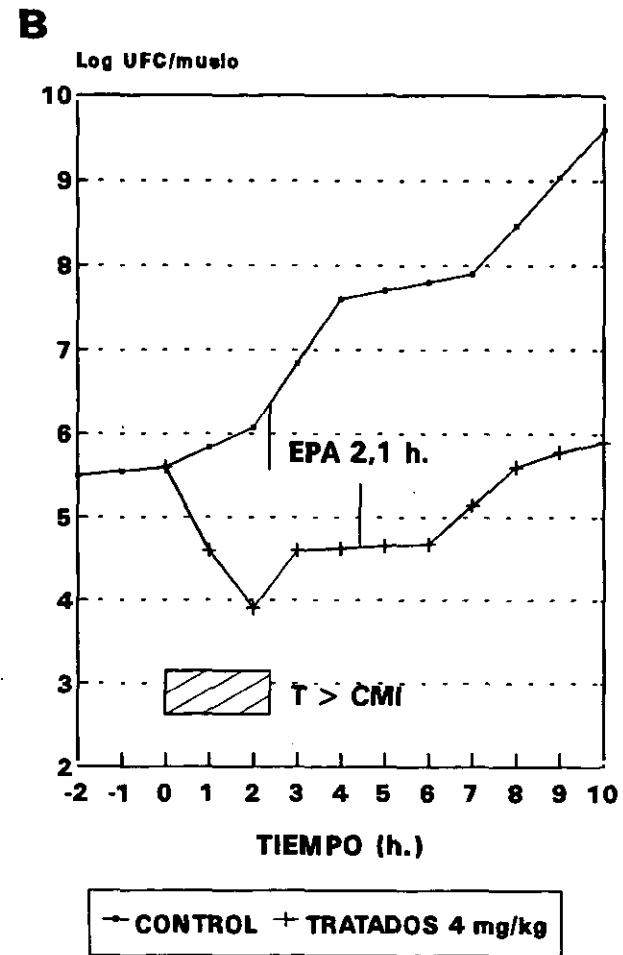
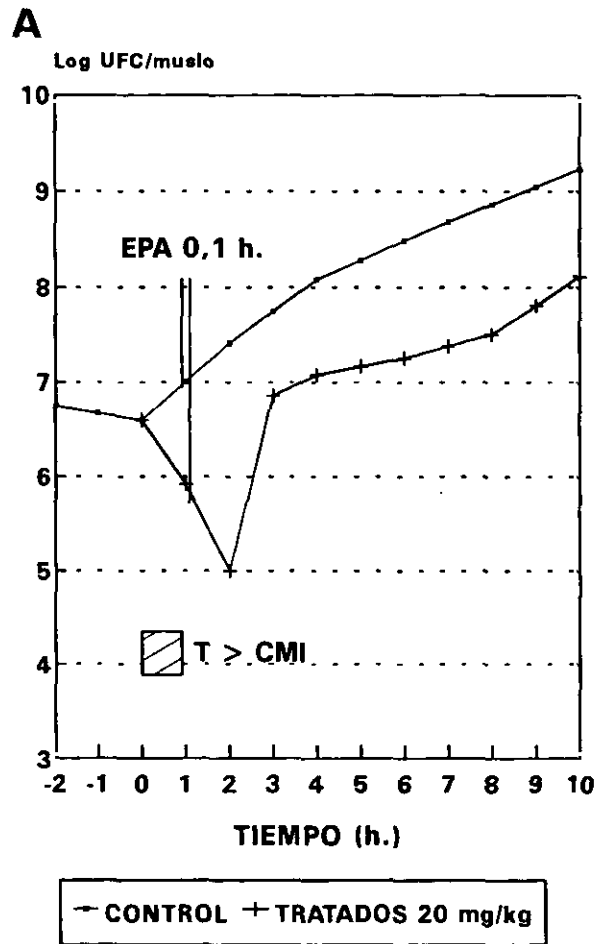


Figura 8. Curvas de efecto postantibiótico (EPA) de meropenem (A) y ciprofloxacino (B) frente a *P. aeruginosa*. La barra representa el tiempo que el antimicrobiano estuvo sobre la CMI.

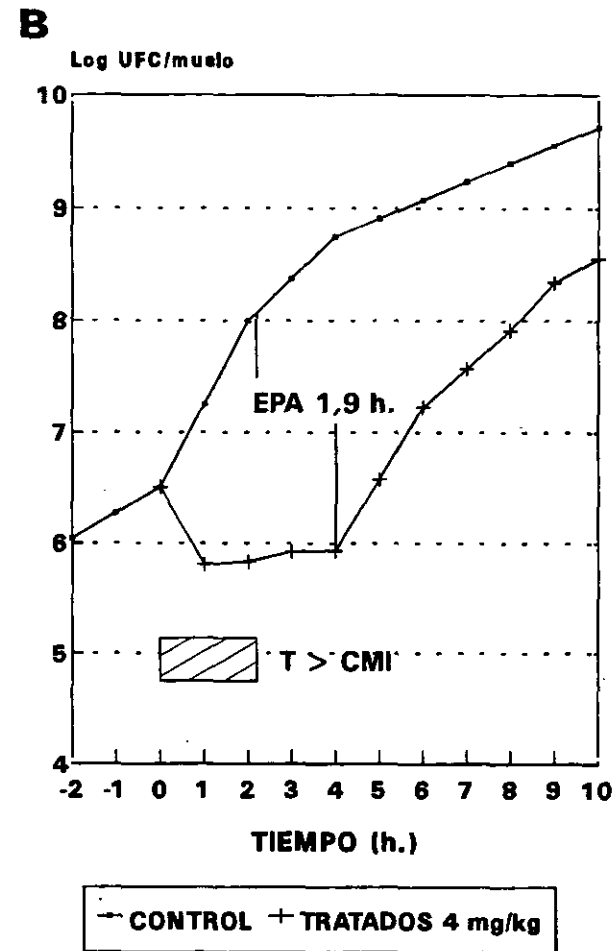
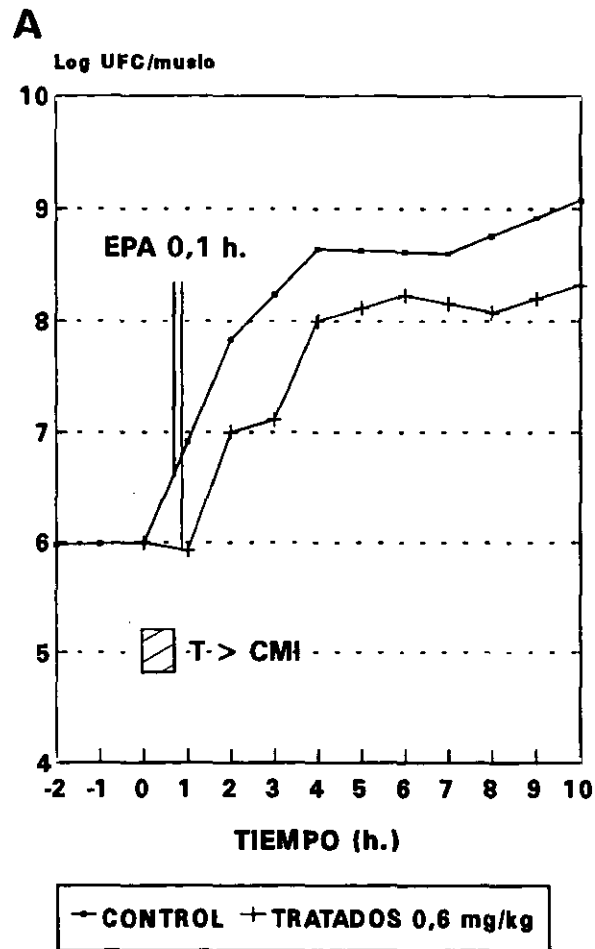


Figura 9. Curvas de efecto postantibiótico (EPA) de meropenem (A) y ciprofloxacino (B) frente a *S. aureus*. La barra representa el tiempo que el antimicrobiano estuvo sobre la CMI.

Tabla IV. Dosis ensayada, tiempo que el antimicrobiano estuvo sobre la CMI, efecto bactericida y efecto postantibiótico "in vivo" (EPA) de meropenem y ciprofloxacino frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Microorganismo	Antimicrobiano	Dosis (mg/kg)	Tiempo sobre CMI (h.)	Efecto bactericida (Log ₁₀ UFC/muslo)	EPA (h.)
<i>E. coli</i>	Meropenem	0,6	0,90	0,87	0,30 ± 0,2
	Ciprofloxacino	0,5	2,40	2,70	3,10 ± 0,6
<i>P. aeruginosa</i>	Meropenem	20	0,92	0,94	0,10 ± 0,4
	Ciprofloxacino	4	2,30	2,17	2,10 ± 0,4
<i>S. aureus</i>	Meropenem	0,6	0,77	0,75	0,10 ± 0,5
	Ciprofloxacino	4	2,10	2,30	1,90 ± 0,2

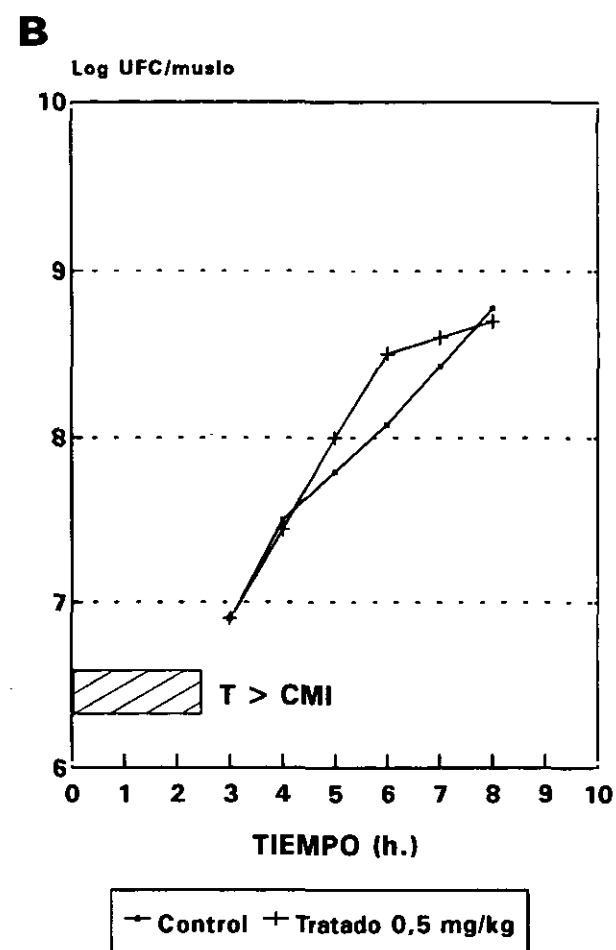
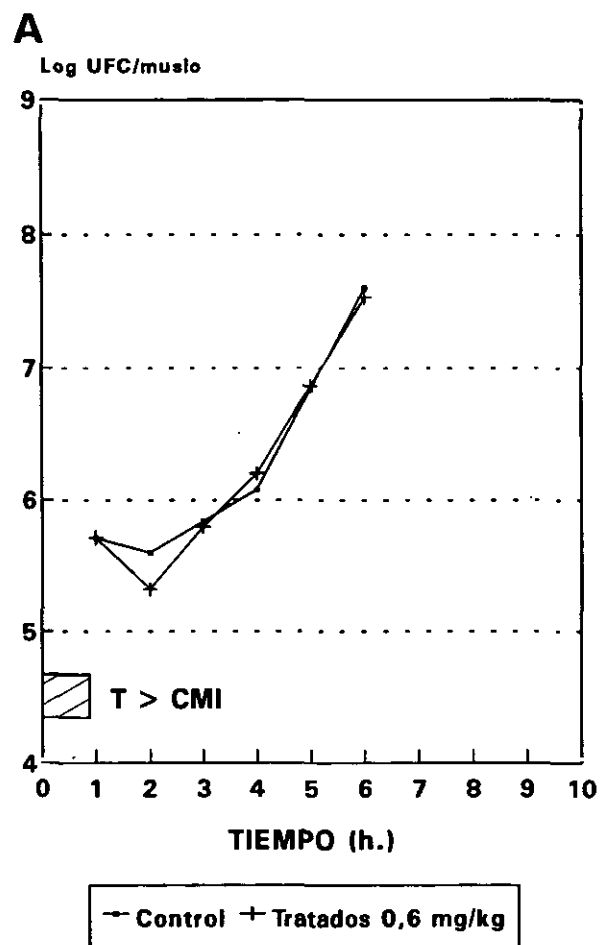


Figura 10. Curvas control de concentraciones subinhibitorias de meropenem (A) y ciprofloxacin (B) frente a *E. coli*. La barra representa el tiempo que el antimicrobiano estuvo sobre la CMI.

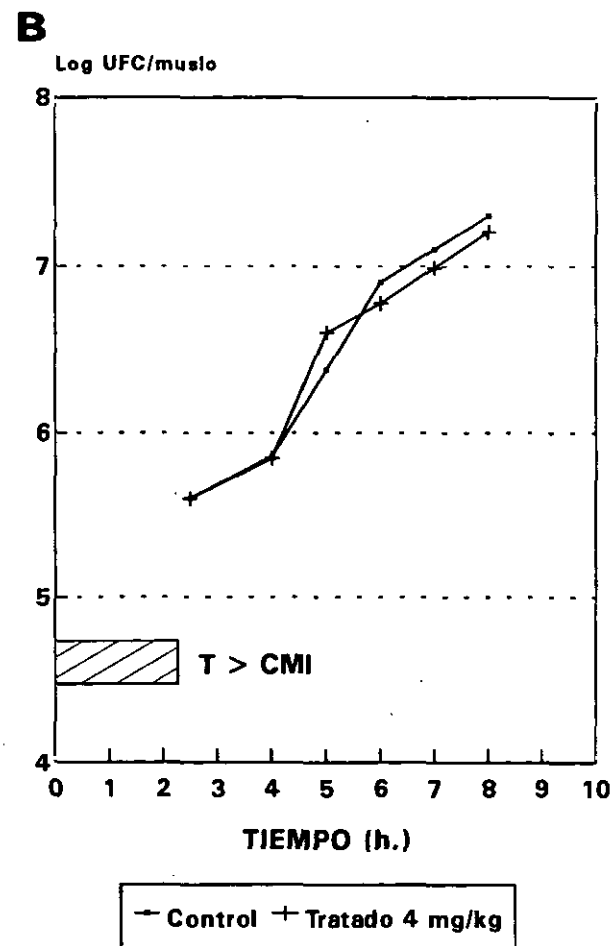
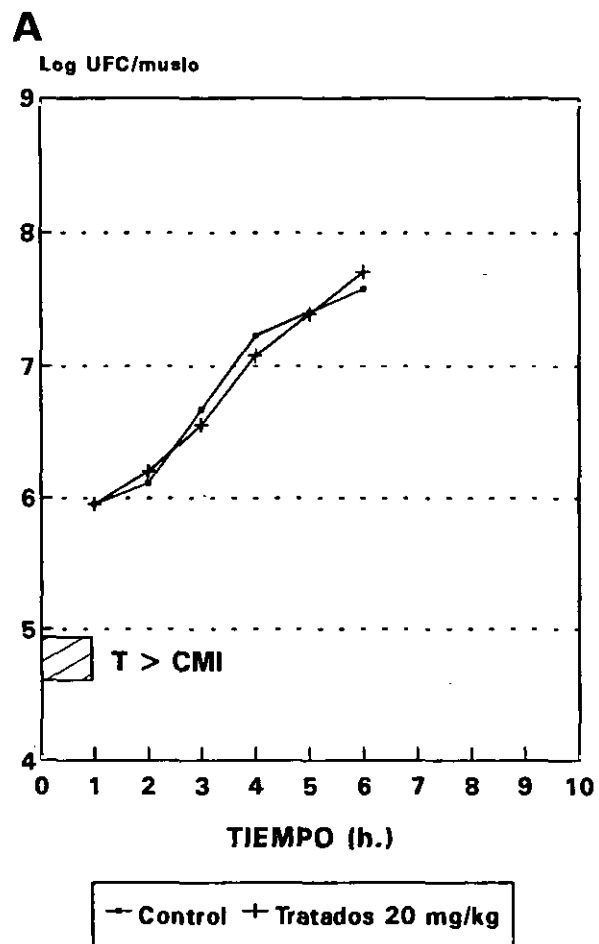


Figura 11. Curvas control de concentraciones subinhibitorias de meropenem (A) y ciprofloxacin (B) frente a *P. aeruginosa*. La barra representa el tiempo que el antimicrobiano estuvo sobre la CMI.

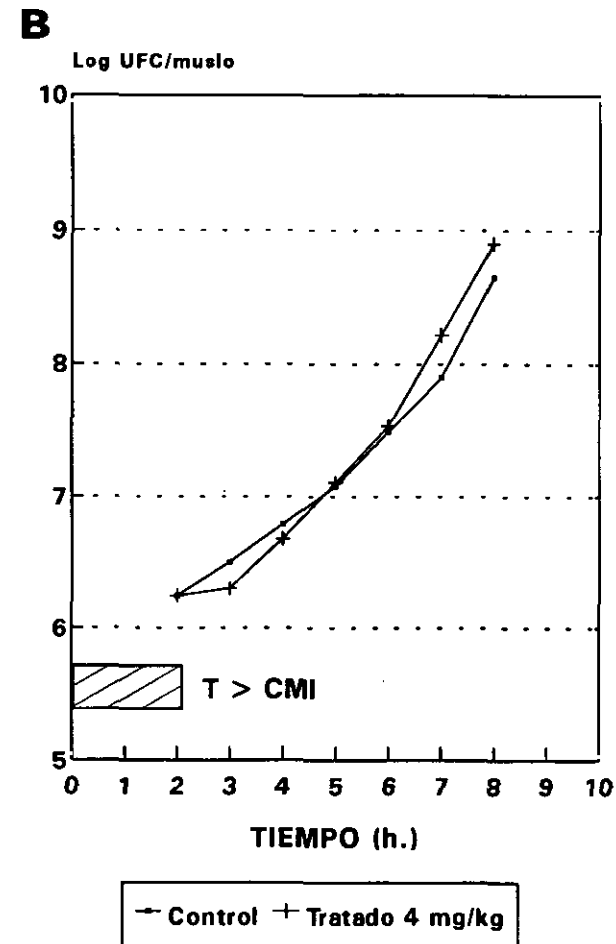
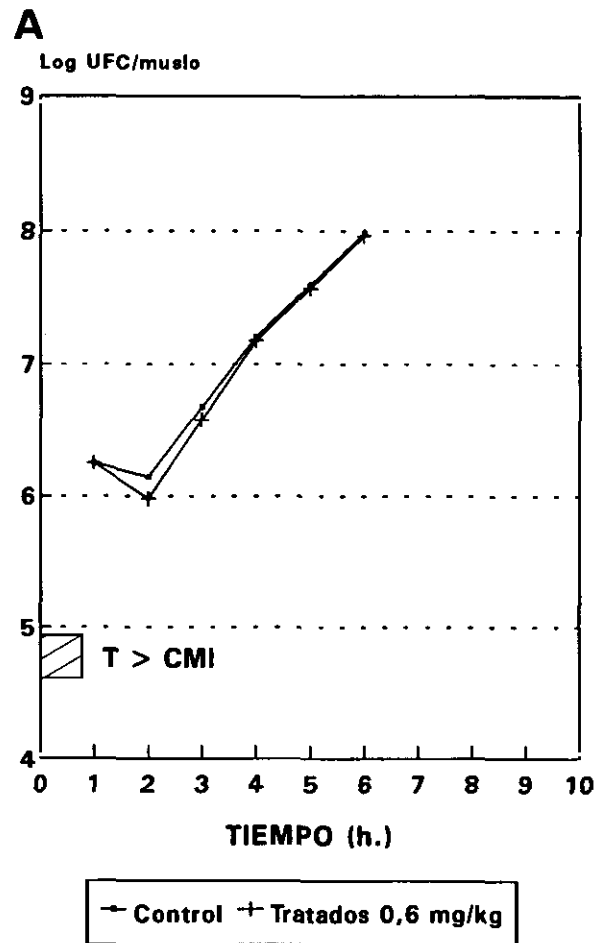


Figura 12. Curvas control de concentraciones subinhibitorias de meropenem (A) y ciprofloxacino (B) frente a *S. aureus*. La barra representa el tiempo que el antimicrobiano estuvo sobre la CMI.

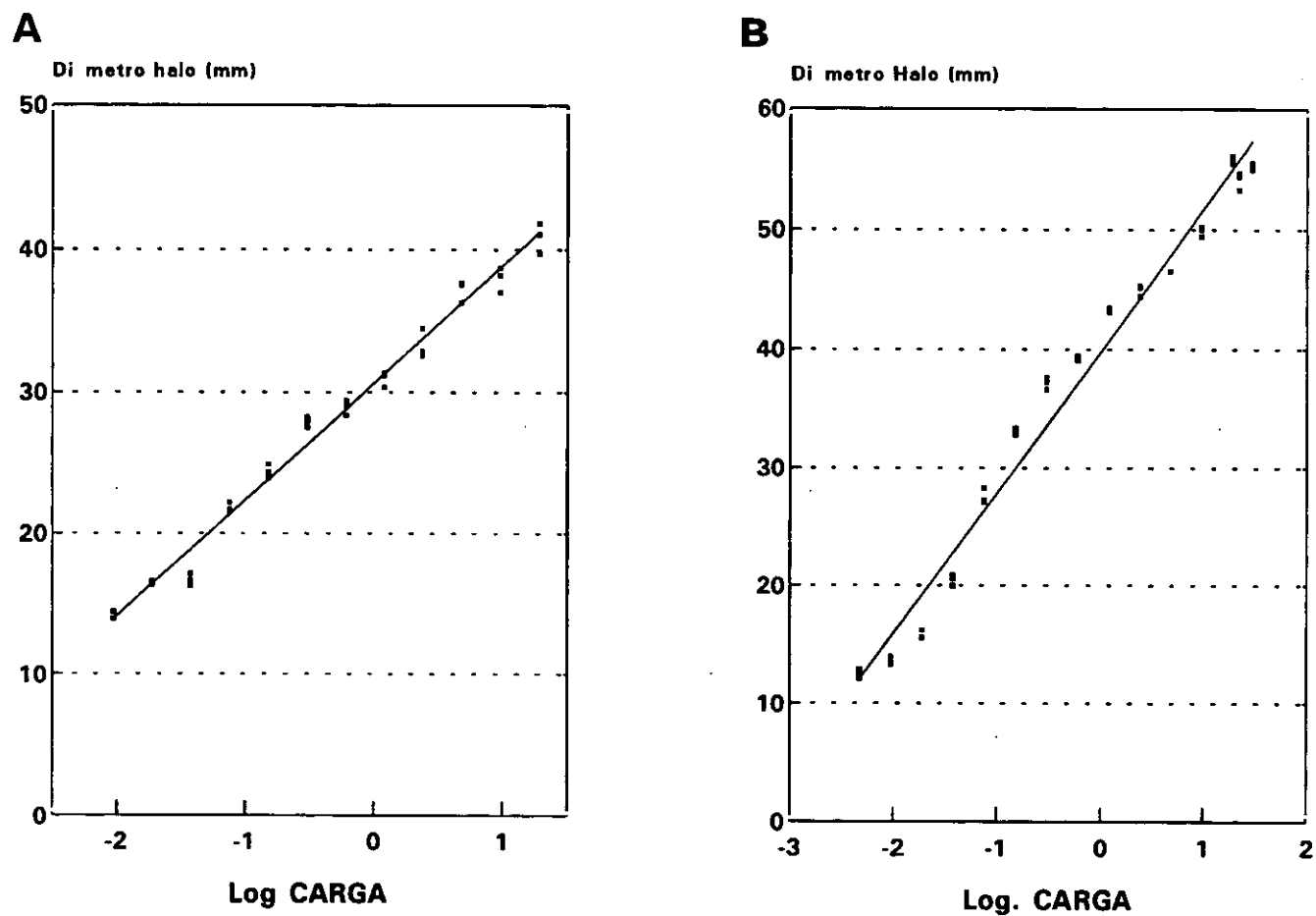


Figura 13. Rectas patrón del diámetro del halo de inhibición frente al logaritmo de la carga de meropenem (A) y ciprofloxacino (B) frente a *E. coli*.

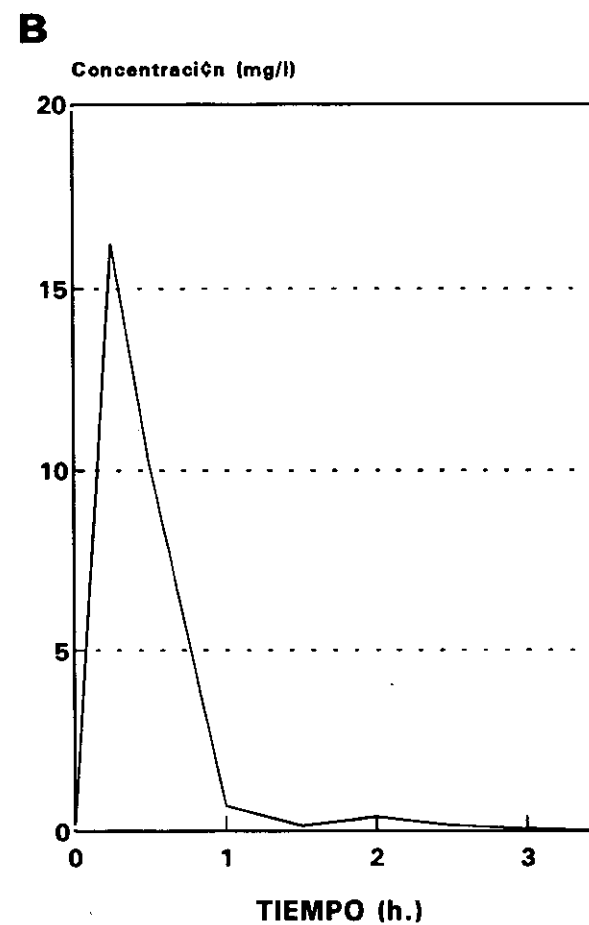
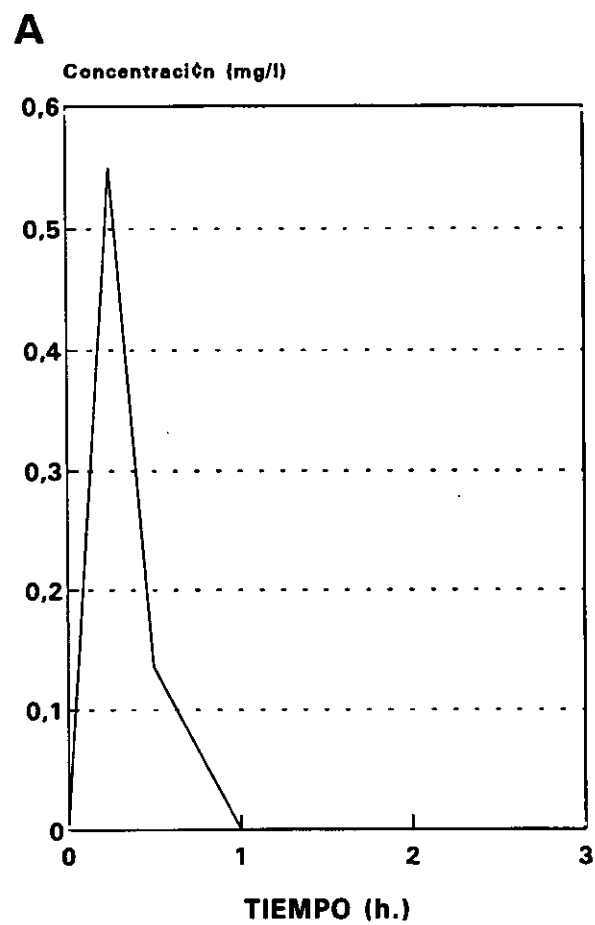


Figura 14. Concentraciones de meropenem en suero de ratón tras las dosis de 0,6 mg/kg (A) y 20 mg/kg (B).

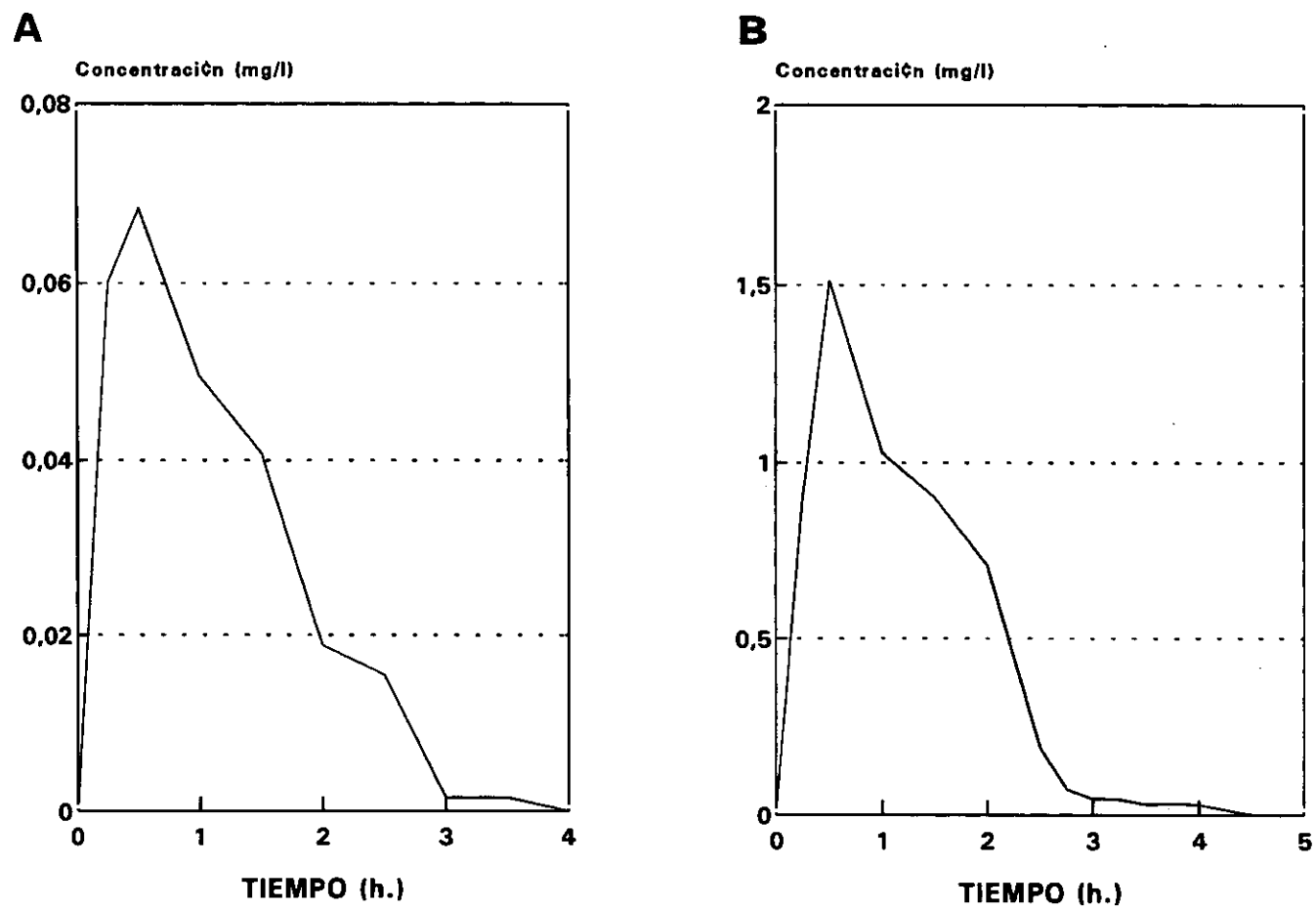


Figura 15. Concentraciones de ciprofloxacino en suero de ratón tras las dosis de 0,5 mg/kg (A) y 4 mg/kg (B).

Tabla V. Valores de diversos parámetros farmacocinéticos obtenidos tras distintas dosificaciones de ciprofloxacino y meropenem.

Antimicrobiano	Dosis (mg/kg)	Conc. Max (mg/l)	Tiempo Max. (h.)	Vida media (T 1/2) (h.)	Area bajo la curva (A.B.C.) (mg·h/l)
Meropenem	0,6	0,54	0,25	0,32	0,11
	20	16,2	0,25	0,41	6,50
Ciprofloxacino	0,5	0,068	0,5	0,44	0,09
	4	1,51	0,5	0,45	1,28

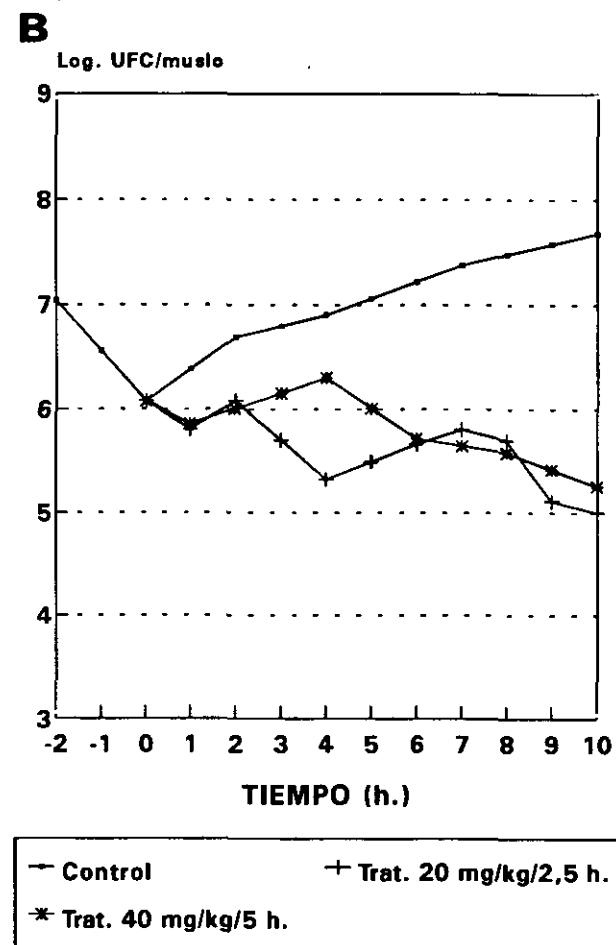
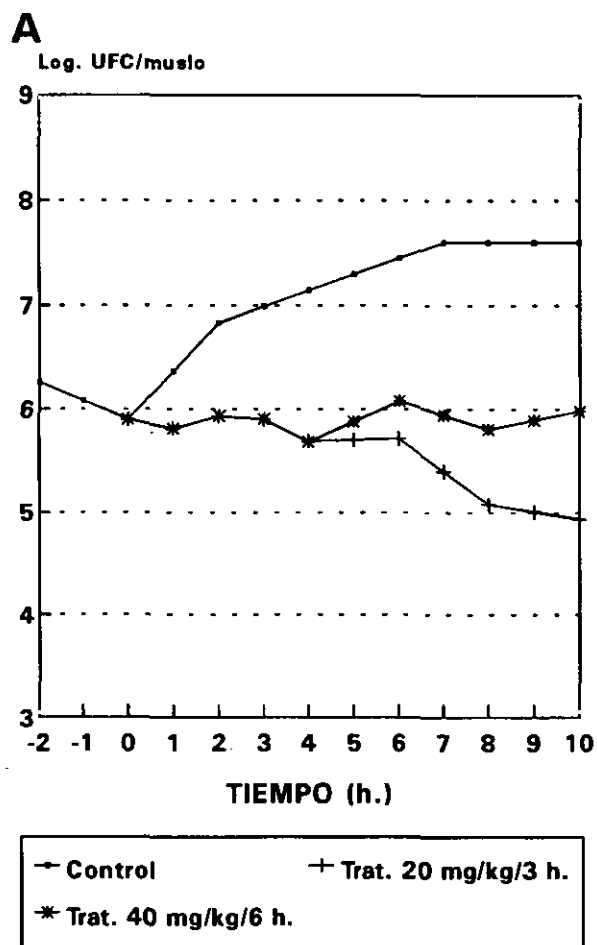


Figura 16. Curvas de letalidad "in vivo" con dos tratamientos diferentes de meropenem frente a *E. coli* (A) y *S. aureus* (B).

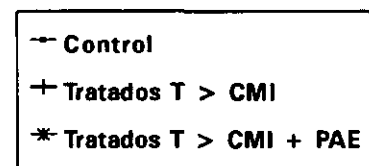
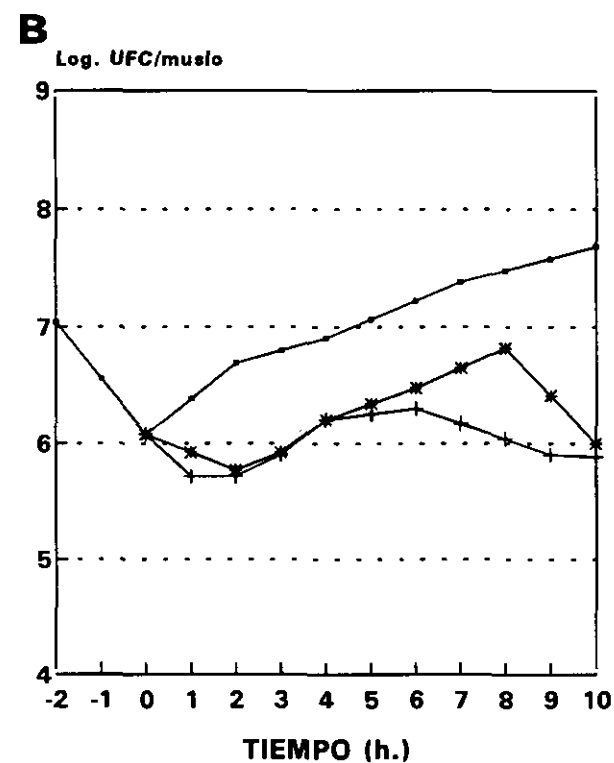
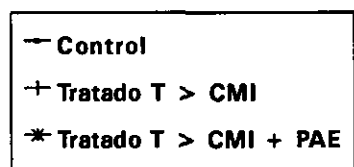
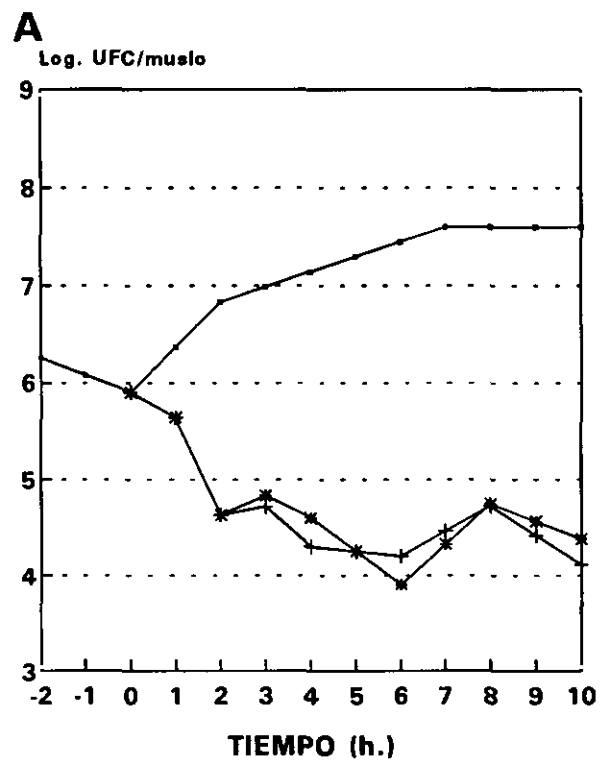


Figura 17. Curvas de letalidad "in vivo" con dos tratamientos diferentes de ciprofloxacino frente a *E. coli* (A) y *S. aureus* (B).

Tabla VI. Efecto bactericida total y por hora de cada tratamiento de meropenem y ciprofloxacino frente a *E. coli* y *S. aureus*.

Antimicrobiano	Microorganismo	Tratamiento	Efecto bactericida 10 ^a h. (Log ₁₀ UFC/muslo)	Efecto bactericida por hora (Log ₁₀ UFC/muslo/h.)
Meropenem	<i>E. coli</i>	20 mg/kg cada 3 h.	2,6	0,26
		40 mg/kg cada 6 h.	1,5	0,15
	<i>S. aureus</i>	20 mg/kg cada 2,5 h.	2,5	0,25
		40 mg/kg cada 5 h.	2,3	0,23
Ciprofloxacino	<i>E. coli</i>	0,5 mg/kg cada 2,5 h.	3,5	0,35
		0,5 mg/kg cada 5,5 h.	3,2	0,32
	<i>S. aureus</i>	4 mg/kg cada 2 h.	1,8	0,18
		4 mg/kg cada 4 h.	1,7	0,17

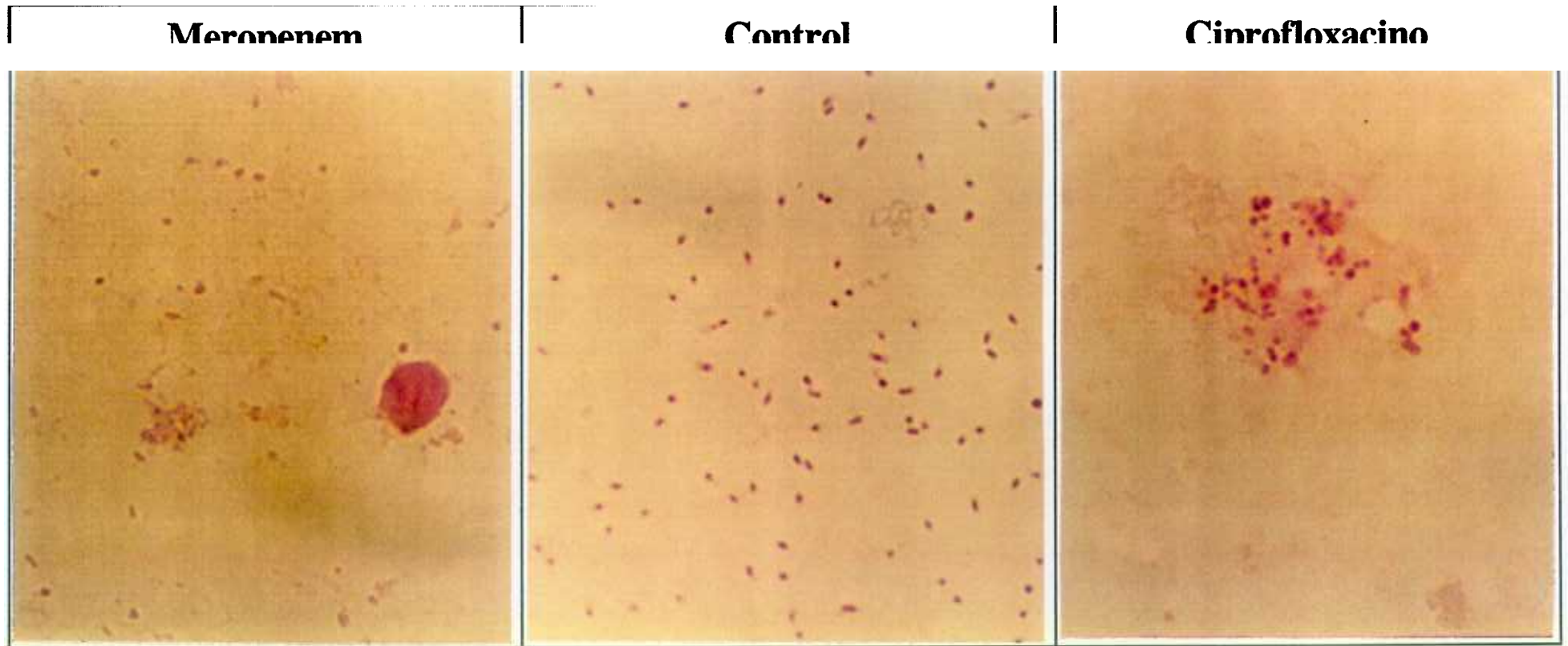


Figura 18. Microfotografías de bacilos de *E. coli* expuestos a la acción "in vivo" de meropenem y ciprofloxacino.

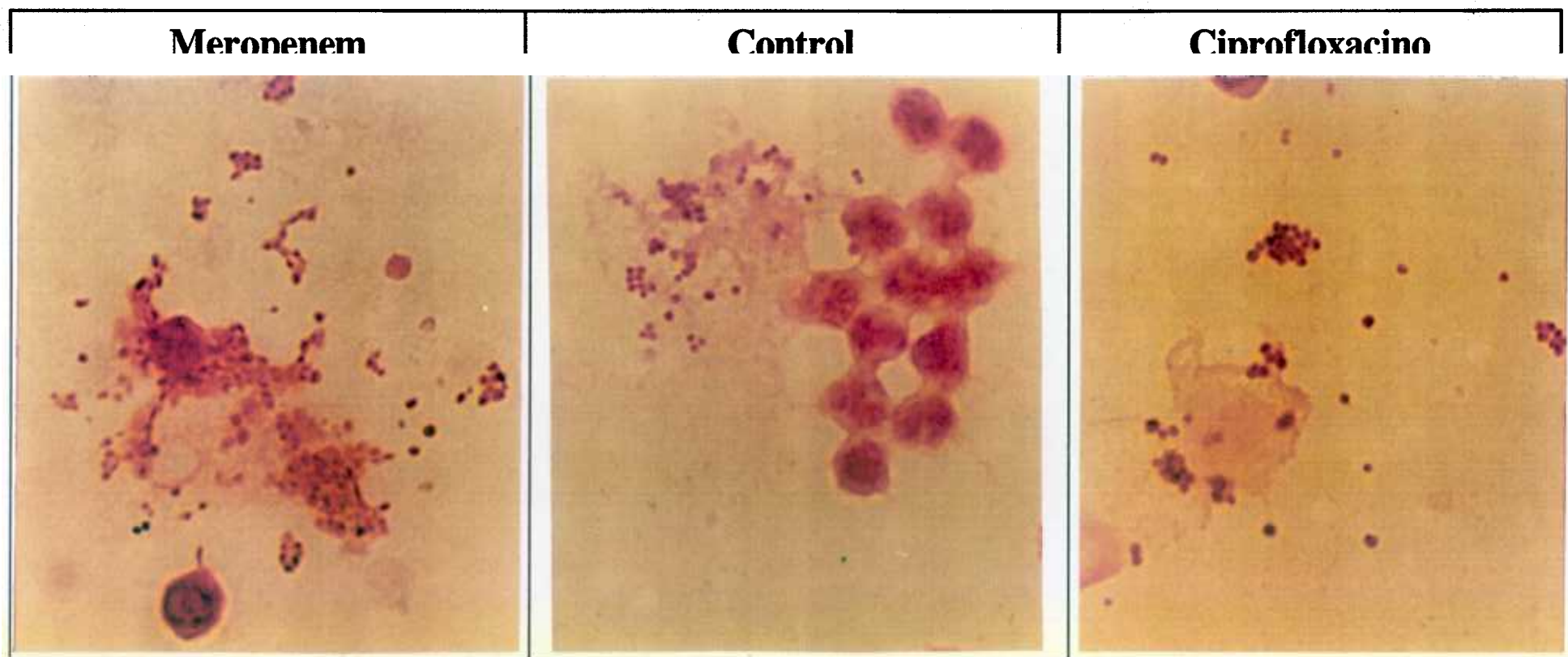


Figura 19. Microfotografías de cocos de *S. aureus* expuestos a la acción "in vivo" de meropenem y ciprofloxacino.

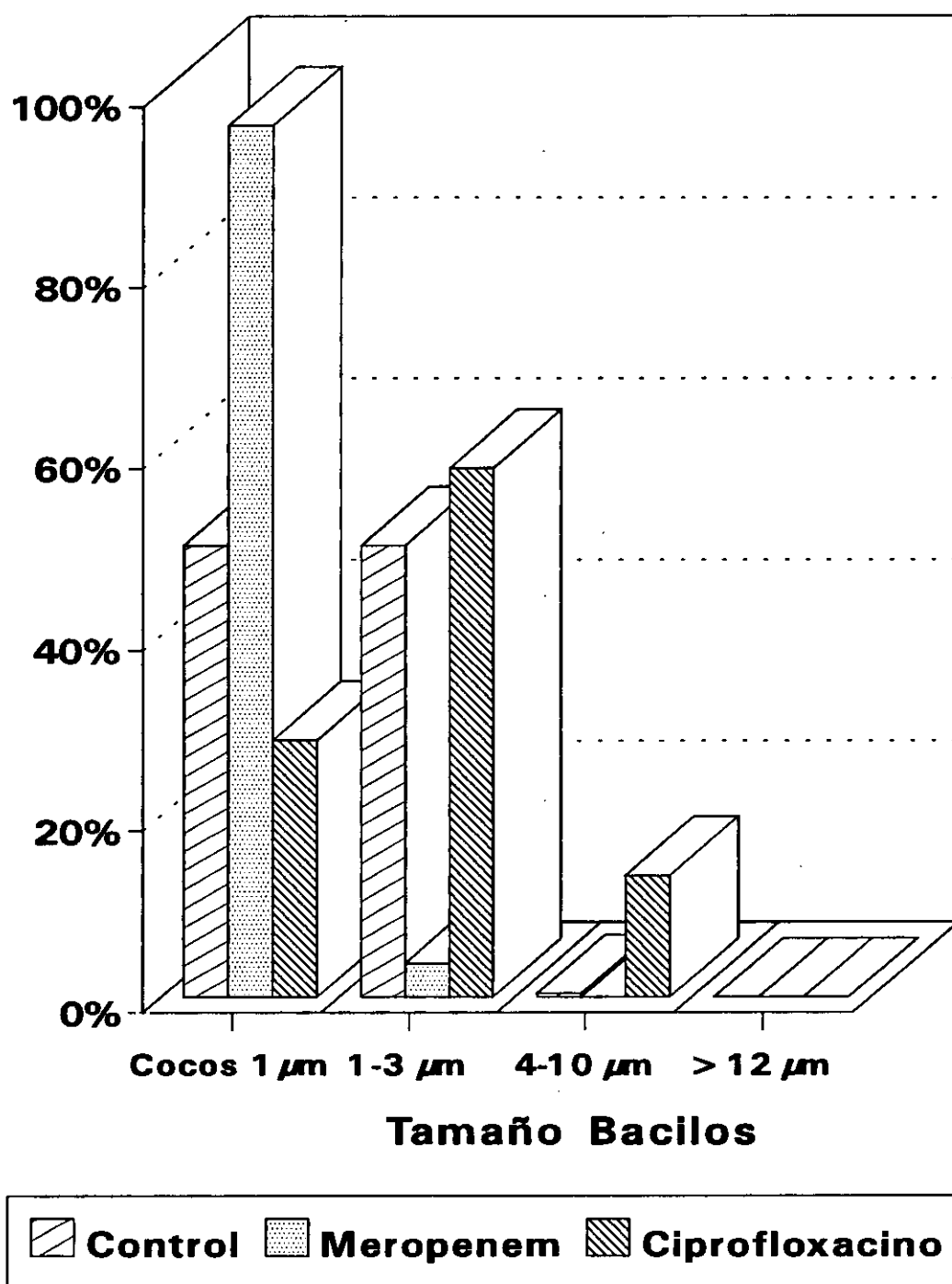


Figura 20. Frecuencia relativa de las distintas morfologías de *E. coli* encontradas "in vivo" tras la administración de meropenem y ciprofloxacin.

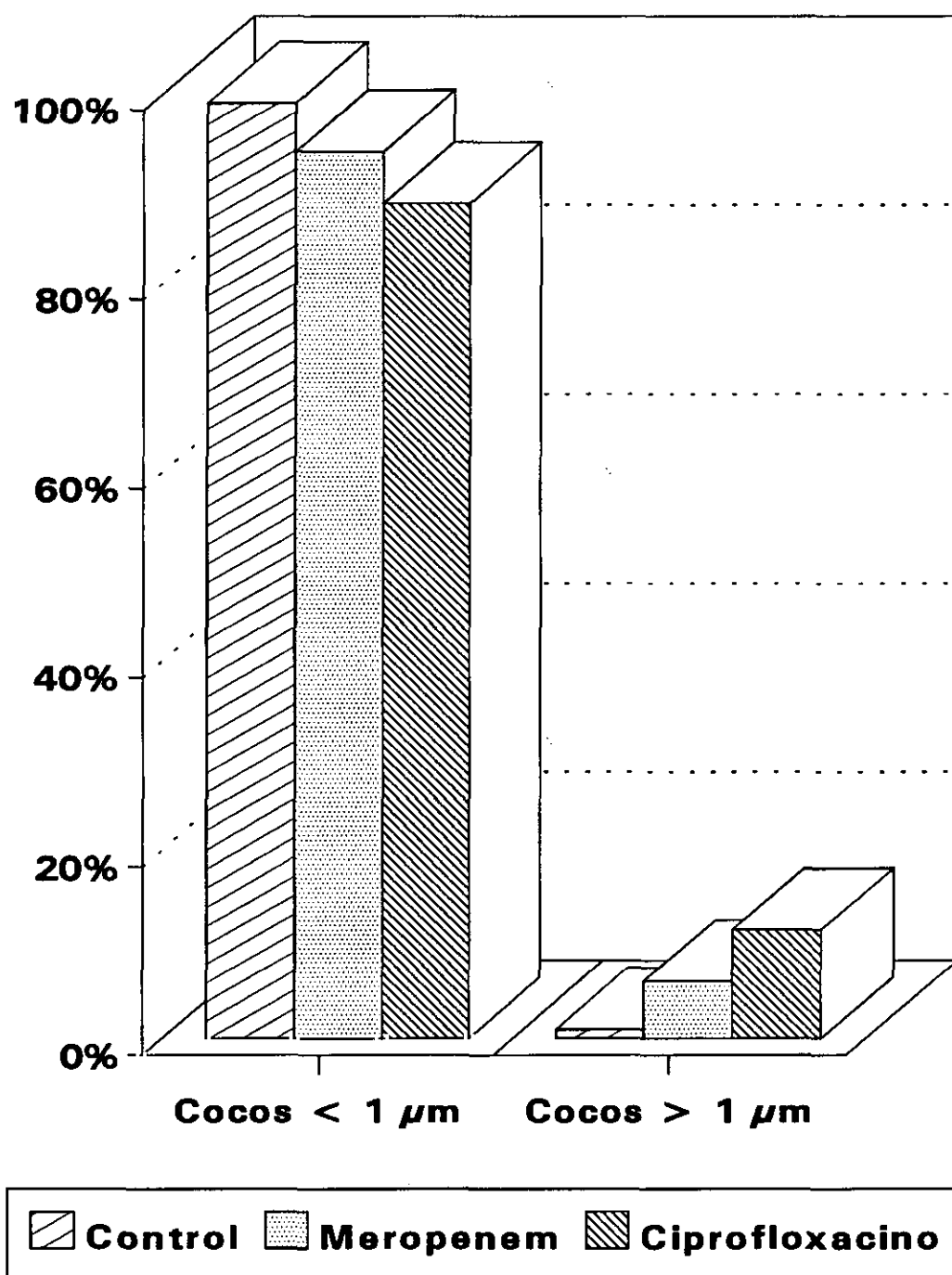


Figura 21. Frecuencia relativa de las distintas morfologías de *S. aureus* encontradas "in vivo" tras la administración de meropenem y ciprofloxacin.

Tabla VII. Comparación estadística (T-Student) de diversas combinaciones en los resultados de efecto postantibiótico (EPA).

Comparación	Medias	P	¿Significativo?
EPA "in vitro": ciprofloxacino-meropenem	2,666 - 0,022	0,01	SI
EPA "in vivo": ciprofloxacino-meropenem	2,266 - 0,166	0,001	SI
Ciprofloxacino: EPA "in vitro"-EPA "in vivo"	2,666 - 2,266	0,58	NO
Meropenem: EPA "in vitro"-EPA "in vivo"	0,022 - 0,166	0,74	NO
EPA "in vitro"-EPA "in vivo"	1,155 - 1,216	0,94	NO

VI. Discusión

La valoración y discusión de los resultados obtenidos debe ir dirigida hacia la utilidad de los parámetros farmacodinámicos en la quimioterapia. Sin embargo, no es posible evaluar conjuntamente todos estos resultados si primero no lo hacemos de forma independiente, ya que cada uno de los fenómenos estudiados en este trabajo requiere un análisis pormenorizado de la metodología utilizada.

1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE EPA

El estudio de forma estandarizada de este parámetro farmacodinámico ha empezado hace pocos años, como ya se ha comentado en la introducción. En este mismo apartado se ha hecho una relación de modelos experimentales tanto "in vitro" como "in vivo", señalando los más importantes. Dado que la comparación de datos depende en gran medida del modelo utilizado, la discusión sobre el EPA se centrará en primer lugar en la evaluación de los modelos experimentales utilizados para su determinación, ya que este fenómeno requiere una metodología más complicada que el estudio de los demás parámetros.

1.1. EVALUACION DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES

1.1.1. Modelo "in vitro"

El método de dilución utilizado para eliminar el antimicrobiano es uno de los más utilizados en la determinación del EPA "in vitro" (39, 90, 195, 196). Su uso es amplio debido a su facilidad, rapidez y mejor comparación con los datos obtenidos con otros autores. El único problema reside en la posible pérdida de UFC cuando el antimicrobiano es muy bactericida. En nuestros experimentos, ciprofloxacino estuvo en el límite de detectabilidad cuando se realizó la dilución 1:1000 después de una hora de exposición.

El EPA fue determinado mediante el seguimiento del número de UFC/ml utilizando el recuento de viables en placa. Este método ha sido y es ampliamente utilizado por su relativa facilidad y rapidez (39). Sin embargo, se han atribuido posibles subestimaciones en el EPA al asumir que hay una correspondencia entre una bacteria y una UFC. Algunos antimicrobianos (sobre todo en β -lactámicos) producen filamentación, con lo que se tomaría un filamento (de 2 a 20 células) como una UFC; al dividirse el filamento rápidamente en células independientes crearía un virtual rápido crecimiento que reduciría el EPA (39, 134). En el caso de los antimicrobianos aquí ensayados, esto sólo podría ocurrir en el caso de meropenem y *P. aeruginosa*, ya que, como veremos más adelante, este antimicrobiano induce la filamentación en este microorganismo (108). Otros métodos como el de espectrofotometría

o el de medida de impedancia son incapaces de medir concentraciones por debajo de 10^4 UFC/ml. El de bioluminiscencia del ATP intracelular está solo basado en que el contenido de ATP es siempre igual en la célula. Este último y el método de cambios en la morfología han dado EPA más prolongados que el de recuento en placa (134).

1.1.2. Modelo "in vivo"

El modelo de infección en muslo de ratón neutropénico utilizado en este trabajo es tal vez el más usado en la determinación del EPA "in vivo" (39, 89, 90, 198). Sus ventajas más importantes son:

- fácil manejo de los animales.
- facilidad en la extracción del muslo para la obtención del número de UFC.
- la inmunodepresión permite ver aisladamente la relación bacteria-antimicrobiano.
- las curvas de control de las concentraciones subinhibitorias comprueban que el EPA no se debe a la acción del antimicrobiano residual.
- los niveles de antimicrobiano en suero son muy similares a las concentraciones en el líquido intersticial del músculo del muslo.

Este último punto ha sido estudiado por algunos investigadores (11, 35, 37, 59, 116, 175). Se ha demostrado que en modelos animales con una relación $AS/V \geq 60$ (AS = área de superficie de contacto entre los capilares y el compartimento que se estudia; V = volumen de líquido que contiene), los niveles de antimicrobiano en suero son muy parecidos a los encontrados en tejidos (177). El modelo de infección en muslo, al igual que los que utilizan compartimentos naturales, tienen una relación AS/V alta. Por tanto, los niveles de antimicrobiano (y sus metabolitos activos) en suero estimarían relativamente bien las concentraciones en el fluido intersticial del músculo del muslo (31, 167, 175, 177). Así mismo se ha comprobado que la farmacocinética es igual en ratones infectados y normales ya que no se origina absceso (debido a la neutropenia) y el edema producido es mínimo (167), no variando entonces la relación AS/V .

Las infecciones control de la actividad antimicrobiana residual se han llevado a cabo utilizando microorganismos en fase de crecimiento exponencial (198), no detectándose actividad con ninguno de los antimicrobianos estudiados. Sin embargo, se corre el riesgo de que bacterias en fase de EPA (tal y como se encuentran realmente en infecciones) si sean susceptibles de ser inhibidas por estas concentraciones subinhibitorias. Algún antimicrobiano como lomefloxacino ha sido activo en concentraciones sub-CMI incluso con bacterias en fase

logarítmica (138). En el caso de otros antimicrobianos, este tema ha de ser estudiado más a fondo, ya que el EPA "in vivo" pudiera estar sobreestimado.

1.2. EVALUACION DE RESULTADOS DE EPA "IN VITRO"

1.2.1. Ciprofloxacino

Este antimicrobiano mostró unos valores de EPA altos frente a los tres microorganismos, siendo sobre *P. aeruginosa* donde el retraso en el crecimiento fue mayor (3,9 h.). Sin embargo, el efecto bactericida en el momento de la dilución fue aproximadamente el mismo para las tres bacterias (de 2,6 a 3 log₁₀UFC/ml). La relación entre concentración/CMI fue mayor en el caso de *E. coli*, ya que se ensayaron concentraciones alcanzadas normalmente en suero, y 0,15 mg/l era muy bajo. De esta manera, parecería que el EPA para esta cepa sería menor en relación a la concentración/CMI; sin embargo, varios autores han señalado que un aumento por encima de 10 veces la CMI no implica un aumento significativo del EPA (39, 200).

Se han publicado muchos estudios sobre el EPA de este antimicrobiano (34, 69, 146, 164, 186, 192, 210). Los valores más representativos obtenidos por otros autores (tabla VIII) están en el rango de los presentados en este trabajo. Para *S. aureus* los EPA fueron de 1,2 a 2,1 horas dependiendo de la concentración, lo que es similar a las 2,0 horas de nuestros resultados. Lo mismo ocurre con *E. coli*, con 1,1-2,5 h. de rango frente a las 2,1 horas de la tabla II. Sin embargo, para *P. aeruginosa* nuestros resultados son significativamente más altos que los de la tabla VIII, aunque nosotros ensayamos el EPA con 12 veces la CMI y no 4.

1.2.1. Meropenem

Esta sustancia sólo indujo EPA significativo (> 0,5 h.) frente a *E. coli* (0,57 h.) y *S. aureus* con 2 h. de exposición (0,65 h.). Frente a *P. aeruginosa* y *S. aureus* con 1 h. de exposición, el EPA fue negativo (-0,3 y -0,83 h., respectivamente). Este último dato presenta gran interés ya que los β -lactámicos son generalmente inductores de EPA en Gram-positivos, mientras que no lo son en Gram-negativos (39). La diferencia entre *S. aureus* con 1 y 2 h. de exposición sería debida a que la actividad de los β -lactámicos estaría en relación con el tiempo sobre la CMI, más que con la concentración (39, 40, 42).

Los valores negativos estarían justificados por el rápido crecimiento de las bacterias

una vez eliminado el antimicrobiano. Este hecho sería explicado por varios fenómenos:

- en primer lugar, la posible formación de aglomerados de células con septo que este antimicrobiano produciría en *S. aureus* en concentraciones iguales a la CMI (figura 6).
- por otro lado, en *P. aeruginosa* se ha observado la formación de filamentos debido a la alta afinidad de meropenem a la PBP 3 de esta bacteria, lo que subestimaría el EPA al haber un crecimiento rápido al eliminar el antimicrobiano (108).

Tabla VIII. Valores de EPA "in vitro" de ciprofloxacino y meropenem obtenidos por otros autores frente a varios microorganismos.

Antimicrobiano	Microorganismo (Ref.)	Concentración (mg/l)	EPA (h.)
Ciprofloxacino	<i>S. aureus</i> (39)	0,5	2,0
	<i>S. aureus</i> (145)	1,5	2,1
	<i>S. aureus</i> (180)	4 x CMI	1,2
	<i>E. coli</i> (169)	0,03	1,2
		0,09	2,5
	<i>E. coli</i> (39)	0,03	2,1
	<i>E. coli</i> (114)	0,16	1,1
	<i>E. coli</i> (180)	4 x CMI	1,9
	<i>E. coli</i> (87)	0,06	1,6
	<i>P. aeruginosa</i> (39)	4	2,4
	<i>P. aeruginosa</i> (180)	4 x CMI	2,0
Meropenem	<i>S. aureus</i> (151)	0,5	0,7
	<i>E. coli</i> (151)	0,5	0,8
	<i>E. coli</i> (160)	0,3	0
	<i>E. coli</i> (99)	4 x CMI	5,2
	<i>P. aeruginosa</i> (151)	8	2,0
	<i>P. aeruginosa</i> (160)	20	-0,3
	<i>P. aeruginosa</i> (99)	4 x CMI	3,9

Son pocos los resultados publicados hasta el momento. Muchos autores que han determinado el EPA "in vitro" de meropenem han obtenido similares resultados a los nuestros (tabla VIII). Los valores son cortos tanto para *S. aureus* como para *E. coli*, aunque Hanberger y cols. (99) han encontrado hasta 5,2 h. Con *P. aeruginosa* se han observado los EPA más elevados (2 y 3,9 h.), lejos de las -0,3 h. aquí obtenidos. Este mismo valor ha sido observado por Odenholt y cols. con esta misma cepa (160). Estos datos contradictorios no

contrastan con los estudios llevados a cabo con imipenem, con el que se ha demostrado que induce EPA tanto "in vivo" como "in vitro" frente a varias bacterias Gram-negativas, particularmente *P. aeruginosa* (5, 28, 151).

Observando la tabla VII podemos ver que hay diferencias significativas entre el EPA "in vitro" de ciprofloxacino y meropenem ($p = 0,01$). Las medias de ciprofloxacino son claramente más altas que las de meropenem, siendo la diferencia de aproximadamente 2,4 h., lo que responde a lo esperado de cada uno atendiendo al grupo de antimicrobianos a que pertenecen (39).

1.3. EVALUACION DE RESULTADOS DE EPA "IN VIVO"

1.3.1. Ciprofloxacino

Este antimicrobiano indujo unos amplios EPA sobre los tres microorganismos estudiados (1,9-3,1 h.). En este caso, fue *E. coli* la cepa con un mayor valor de efecto postantibiótico (3,1 h.). Para las otras dos cepas, los valores estuvieron alrededor de 2 h..

El tiempo que ciprofloxacino estuvo sobre la CMI fue alto, alrededor de 2-2,5 h., teniendo por ello unos valores de efecto bactericida también altos (2,17-2,70 Log_{10} UFC/muslo). En el caso de *E. coli*, el efecto bactericida fue mayor debido a que la relación dosis/CMI era alta (33 x CMI) al igual que en el EPA "in vitro". Sin embargo, los tiempos sobre la CMI en suero no fueron muy diferentes entre sí, debido posiblemente a la alta tasa de eliminación en el ratón. La elección de esta concentración se hizo teniendo en cuenta los niveles que ciprofloxacino alcanza normalmente en suero con dosis terapéuticas.

El mecanismo del EPA de las quinolonas no está dilucidado todavía, pero parece ser debido a un daño no letal que se produce en el ADN o en la ADN-girasa. Estos antimicrobianos tienen una acción bactericida y el EPA sería el tiempo que se necesita en reparar los daños producidos en la célula (70, 134). Guan y cols. (86) han estudiado el EPA de varias quinolonas desde el punto de vista de la síntesis de ADN, ARN, y proteínas, observando una correlación entre la definición clásica del EPA y el tiempo que tarda *E. coli* en alcanzar los niveles normales de síntesis de ADN.

El posible efecto de las concentraciones subinhibitorias en el alargamiento del EPA queda descartado al observar las figuras 10, 11 y 12. En ellas se muestra el crecimiento de bacterias en fase logarítmica inyectadas en ratones control y tratados una vez que el

antimicrobiano ha descendido de la CMI. Las curvas son similares, no detectándose diferencias significativas. La falta de actividad de concentraciones sub-CMI puede ser debida a la alta constante de eliminación del ratón, unas seis veces la del hombre. Sin embargo, sería más conveniente el realizar estos controles con bacterias en fase de EPA, ya que, como veremos más adelante, el efecto de las sub-CMI puede ser mayor en esta fase que en la de crecimiento en fase exponencial (138).

La comparación con otros investigadores es difícil debido a los pocos datos disponibles y publicados. Solo frente a *E. coli* y *P. aeruginosa* se han encontrado EPA de 2,6 y 3,8 h. respectivamente (tabla IX). Estos ensayos fueron realizados en el mismo modelo que el empleado en este trabajo, pero con dosis mayores (3,2 y 50 mg/kg frente a 0,5 y 4 mg/kg).

Las diferencias entre el EPA "in vitro" e "in vivo" de ciprofloxacino no fueron significativas (tabla VII). Aunque para *P. aeruginosa* el valor de este último es más bajo, la media de los tres microorganismos es de 2,66 frente a 2,26 respectivamente. Este dato demuestra una buena correlación entre el método utilizado "in vitro" e "in vivo" para este antimicrobiano.

Tabla IX. Valores de EPA "in vivo" de ciprofloxacino e imipenem obtenidos por otros autores frente a varios microorganismos.

Antimicrobiano	Microorganismo (Ref.)	Dosis (mg/kg)	EPA (h.)
Ciprofloxacino	<i>E. coli</i> (39)	3,12	3,8
	<i>P. aeruginosa</i> (39)	50	2,6
Imipenem	<i>S. aureus</i> (168)	80	1,8
	<i>E. coli</i> (168)	80	2,9
	<i>E. coli</i> (92)	25	-0,1
	<i>P. aeruginosa</i> (39)	50-200	0,9-4,6
	<i>P. aeruginosa</i> (168)	80	2,4
	<i>P. aeruginosa</i> (102)	120	0

1.3.2. Meropenem

Los EPA inducidos por este antimicrobiano no fueron significativos ($> 0,5$ h.), aunque no se observaron valores negativos. Sin embargo, el tiempo que el antimicrobiano estuvo sobre la CMI fue menor que en el caso de las ciprofloxacino (de 0,77 a 0,92 h.), tal vez debido a la alta vida media de la quinolona frente a meropenem (tabla V). El efecto

bactericida fue también menor (0,75-0,94 Log₁₀UFC/muslo), siendo el más alto frente a *P. aeruginosa*. Este parámetro no parece tener influencia en la duración del EPA, ya que las bacterias se recuperaron rápidamente tras la desaparición del antimicrobiano (figuras 7, 8 y 9).

Algunos estudios han señalado que la actividad de los β -lactámicos está relacionada con el tiempo sobre la CMI (39, 40, 42). Si esto es así, los cortos $T > CMI$ aquí obtenidos podrían ser los causantes del bajo valor de EPA. Sin embargo, se han dado otras explicaciones a este hecho: Craig y cols. (39) han indicado que estos antimicrobianos inducen la formación de filamentos sobre bacterias Gram-negativas y aglomerados de células en Gram-positivas; en el caso de meropenem, parece que sobre *P. aeruginosa* induce filamentación (al unirse a la PBP 3), y en *E. coli* esferoplastos o células sin pared celular (108). Tanto unos como otros subestimarían el crecimiento al no sobrevivir bien sobre agar (esferoplastos) o contar un filamento como una UFC. Una vez que el antimicrobiano es eliminado ($T > CMI$), los filamentos podrían dividirse rápidamente incrementando el número de UFC/muslo y reduciendo el EPA. En Gram-positivos ocurriría algo similar con los aglomerados celulares ("clusters"). Esta explicación ha sido investigada "in vitro" por Odenholt y cols. (160), mediante la medición del EPA con dos técnicas distintas (recuento en placa y medición de densidad óptica), no encontrando diferencias significativas en los valores de EPA.

El mecanismo de inducción de EPA por este antimicrobiano no está investigado, ya que es muy nuevo. Si hay estudios sobre el de imipenem, que tiene unas características muy similares al ser del mismo grupo, e induce EPA sobre bacterias Gram-negativas. En primer lugar, el EPA representaría el tiempo necesario para la disociación entre el antimicrobiano y su objetivo (las PBPs), además de un periodo de resíntesis de algunas enzimas necesarias para la división bacteriana (61). Sobre este tema se propuso que imipenem causaría EPA al unirse preferentemente a la PBP 2 en bacilos Gram-negativos (82) al igual que mecilinam, con el que se había detectado un EPA significativo mediante medición de conductancia eléctrica. Sin embargo, Majchercyk y cols. (136) y posteriormente Erlendsdottir y cols. (61) investigaron este hecho utilizando mutantes PBP 2 termosensibles los primeros y recuento en placa los últimos, llegando a la conclusión de que el EPA no se debía a la unión a la PBP 2. Tal vez sea inducido por la gran afinidad de estos carbapenemas a estas proteínas, lo que haría dificultosa la disociación antimicrobiano-PBP (134).

El corto y no significativo EPA encontrado con meropenem no se debió a la acción de concentraciones subinhibitorias, lo que se observa en las figuras 10, 11 y 12. Para *E. coli*

se vió un descenso no significativo en la curva de ratones tratados, pero el crecimiento hasta el final del experimento fue paralelo.

No se han publicado datos sobre el EPA "in vivo" de meropenem hasta la fecha al ser un antimicrobiano muy nuevo. Sin embargo, el efecto postantibiótico "in vivo" de imipenem ha sido estudiado por varios autores, mostrándose en la tabla IX los valores obtenidos así como las dosis ensayadas. Como podemos apreciar, el único valor con Gram-positivos (*S. aureus*) fue encontrado por Renneberg y cols. (168) (1,8 h.) con un modelo de piezas de algodón implantadas en ratones. Sobre Gram-negativos se han realizado más investigaciones al comprobar que al contrario de los demás β -lactámicos, este antimicrobiano inducía EPA sobre estos microorganismos; de esta forma, sobre *P. aeruginosa* se ha observado EPA significativo con los modelos de infección en muslo y piezas de algodón (tabla VIII), aunque las dosis empleadas fueron altas (de 50 a 200 mg/kg). De otro lado, Hessen y cols. no obtuvieron EPA significativo con un modelo de endocarditis en ratas (101, 102). Con *E. coli*, los datos disponibles son igualmente confusos, ya que si Renneberg y cols. hallaron un EPA de 2,9 h. con el modelo de piezas de algodón en ratón, Gudmundsson y cols. obtuvieron un valor negativo (-0,1 h.) con el de infección en muslo (91). Todos estos datos apuntan a que el EPA de imipenem sobre Gram-negativos debe depender de muchos factores o que está muy relacionado con el microorganismo estudiado. Del mismo modo, si meropenem se comporta de manera similar a imipenem, nuestros datos tanto con *E. coli* como con *P. aeruginosa* parecen demostrar que el EPA de este grupo de antimicrobianos es muy corto o no relevante.

Al igual que ocurría "in vitro", la diferencia estadística entre el EPA "in vivo" de ciprofloxacino y meropenem fue significativa ($p = 0,001$, tabla VII). No lo fue cuando la comparación se hizo entre el EPA "in vivo" e "in vitro" de meropenem ($p = 0,74$). Esto demuestra una buena correlación entre los métodos utilizados "in vitro" como "in vivo", lo que se observa al comparar los datos totales "in vitro" e "in vivo" ($p = 0,94$).

2. EL EFECTO DE CONCENTRACIONES SUB-CMI "IN VITRO" E "IN VIVO"

Los efectos de las concentraciones sub-CMI son conocidos desde hace mas de 40 años (55). Entonces se sugirió que la penicilina debía ser administrada en dosis continuas para tener una buena actividad terapéutica. Aunque estudios posteriores han incluido el EPA como factor a favor de las dosis intermitentes, no puede por sí solo explicar el éxito que algunos tratamientos han tenido con este tipo de dosificación, ya que la suma de los tiempos de EPA y tiempo sobre la CMI no bastan para cubrir el intervalo entre dosis (160). Ha sido después de estas observaciones cuando los efectos de las concentraciones subinhibitorias han empezado

a ser estudiadas como un parámetro más en la evaluación de cualquier nuevo antimicrobiano.

Los efectos de concentraciones sub-CMI sobre las bacterias son diversos: cambios en los factores de virulencia (104), en expresión de exoenzimas (84), en la adhesión a superficies (211), incremento o descenso de fagocitosis por PMNs (163), etc. De entre ellos hemos estudiado dos que están relacionados con el EPA de forma muy directa: efectos sobre el crecimiento y la morfología de las bacterias.

2.1. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

Como ya se indicó en la introducción, el efecto que las sub-CMI tienen sobre los microorganismos depende el estado en que estas se encuentren (160). En este trabajo, se ha estudiado este parámetro sobre bacterias en fase de EPA ya que su efecto podría ser un complemento al los experimentos de EPA, al alargar la actividad de las concentraciones supra-CMI.

2.1.1. Meropenem

Como se observa en las gráficas, los efectos de 1, 1/2, 1/4 y 1/8 x CMI sobre *E. coli* (figura 1) no son significativos (< 0,5 h., tabla III). Por el contrario, sobre *S. aureus* se inducen unos retrasos en el crecimiento (ECS EPA) significativos incluso con 1/8 x CMI (1,14 h., tabla III). De igual forma, podemos ver que con la CMI el efecto es mucho mayor en este último microorganismo que en el primero. Esto indicaría una mayor afinidad de meropenem por las PBP's de *S. aureus* que de *E. coli*, ya que a concentraciones menores se inhibe más el crecimiento. No obstante sería necesario estudiar el efecto sobre bacterias en fase exponencial de crecimiento (ECS), ya que este valor puede ser menor. Odneht y cols. (160) han estudiado estos mismos efectos de meropenem sobre Gram-negativos (*P. aeruginosa* y *E. coli*), encontrando un gran efecto sobre la primera cepa tanto en bacterias en fase de EPA (ECS EPA) como en crecimiento exponencial (ECS) (14 y 15 h. respectivamente con 0,3 x CMI). Sin embargo, frente a *E. coli* no se encontraron nada más que cortos retrasos (1,7 y 0,2 h respectivamente también con 0,3 x CMI). Estos resultados concuerdan con los aquí obtenidos y los conseguidos con imipenem (158), en los que frente a *P. aeruginosa* se daban valores de 9-10 h. de retraso en el crecimiento con 0,3 x CMI, aunque con *E. coli* no se hicieron ensayos.

Los ECS y ECS EPA se han estudiado también el otros β -lactámicos como bencilpenicilina, cefcanel, ampicilina, piperacilina, etc. (158, 159). En casi todos se han

llegado a encontrar ECS EPA mayores que ECS (bencilpenicilina, cefcanel) incluso con concentraciones de 0,1 x CMI.

El mecanismo de esta mayor acción subinhibitoria en fase de EPA por parte de los β -lactámicos no se conoce muy bien. Se ha argumentado a favor de una posible inhibición por parte de pequeñas cantidades de antimicrobiano de las nuevas PBPs sintetizadas tras la acción de concentraciones supra-CMI, con lo que el crecimiento sería inhibido por más tiempo (160). Sin embargo, el gran ECS y ECS EPA encontrado con imipenem y meropenem frente a *P. aeruginosa* no se adapta a esta explicación. Tal vez se deba a una mayor lentitud de esta especie en la síntesis de estas proteínas junto con una mayor afinidad de estos antimicrobianos a sus PBPs.

2.1.2. Ciprofloxacino

En este caso, los valores de ECS EPA encontrados son mucho mayores que en el caso de meropenem. Al contrario que este, *E. coli* mostró una mayor sensibilidad a las concentraciones subinhibitorias, encontrándose retrasos de hasta 3,06 h. con 1/8 x CMI (tabla III). En las figuras 1B se puede apreciar como ciprofloxacino ejerce una acción bacteriostática tanto con 1/8 x CMI, mientras que con 1/4 y 1/2 x CMI la acción es bactericida. En el caso de *S. aureus*, no se encuentra acción bactericida (salvo un ligero descenso de UFC en 1/2 x CMI), pero hay que puntualizar que el ECS EPA encontrado con todas las fracciones de CMI ensayadas son igualmente altos.

Este mayor efecto sobre *E. coli* puede ser explicado por su mayor sensibilidad, hecho que se puede observar también en la curva de EPA "in vivo" (figura 7). De todas formas, si el EPA en quinolonas es debido al tiempo que tardan en repararse los daños en el ADN o el periodo necesario para que empiece de nuevo la síntesis de ADN (87), las sub-CMI podrían ser suficientes para inactivar e impedir estos procesos, dependiendo tanto de la afinidad por la girasa en cada especie como de la acumulación del antimicrobiano dentro de la bacteria.

La única quinolona cuyo ECS y ECS EPA ha sido estudiado hasta el momento es esparfloxacino. Odenholt y cols. (159) encontraron para este antimicrobiano y dos especies de Gram-positivos una diferencia significativa entre su ECS y ECS EPA de aproximadamente 3,5 h. con 0,3 x CMI, similares a los aquí obtenidos con *S. aureus* con 0,5 x CMI. Con ciprofloxacino no se han realizado ensayos de ningún tipo con sub-CMI. Por otro lado, antimicrobianos de otros grupos como teicoplanina, vancomicina y roxitromicina han inducido también un ECS EPA mayor que ECS, lo que demuestra que el efecto de los antimicrobianos

en concentraciones subóptimas depende claramente del estado en el que se encuentre la bacteria. Del estudio de todos estos datos parece observarse una relación entre un largo EPA y un amplio efecto bactericida con la inducción de efectos sub-CMI (159, 160), lo que concordaría con los datos de este trabajo, donde ciprofloxacino (con mayor EPA y efecto bactericida) induciría mas ECS EPA que meropenem.

El ECS EPA y ECS también ha sido estudiado "in vivo", aunque los datos son pocos. Sólo se ha estudiado el caso de aspoxicilina, piperacilina y benzilpenicilina (157, 161), observándose un alargamiento del EPA "in vivo" cuando no se inyectaba β -lactamasa para inactivar el antimicrobiano. Sin embargo, estos estudios no se han realizado con otros grupos de antimicrobianos, con los que es más difícil inactivar el agente mediante enzimas. El efecto "in vivo" se produciría con antimicrobianos con larga vida media, con los que habría que realizar controles para discernir el EPA y el ECS.

2.2. EFECTO SOBRE LA MORFOLOGIA BACTERIANA

Los cambios en la forma y la ultraestructura de las bacterias han sido estudiados por otros autores tanto "in vitro" como "in vivo", como ya se indicó en la introducción. Los modelos utilizados "in vivo" han corroborado en gran manera los datos obtenidos mediante las técnicas empleadas "in vitro", con algunas diferencias. Parece que los resultados se ajustan mejor si la técnica "in vitro" de membranas es empleada, ya que proporciona una superficie sólida para el crecimiento de las bacterias, más parecido a la realidad "in vivo" (132). Las diferencias encontradas se pueden deber a la dificultad que existe "in vivo" de mantener concentraciones sub-CMI, ya que casi siempre se requiere alcanzar previamente niveles por encima de la CMI.

Los efectos de meropenem y ciprofloxacino sobre la morfología de los microorganismos ensayados han sido estudiados mediante dos técnicas estándar muy utilizadas y que permiten una comparación entre ellas y con los datos de otros autores, aunque los disponibles son pocos. El modelo "in vivo" permite la observación de los microorganismos cuando los niveles de antimicrobiano se encuentran en niveles sub-CMI, y la técnica de membranas "in vitro" asegura una exposición directa y en condiciones muy parecidas a las infecciones "in vivo". Los dos grupos de antimicrobianos a los que pertenecen las sustancias aquí estudiadas inducen unos efectos en la morfología más visibles que otras clases de antibióticos.

2.2.1. Meropenem

A.- En el caso de *E. coli* se observa que la forma predominante en los experimentos "in vitro" es la de esferoplastos o formas celulares con la pared celular debilitada y redondeadas. Todas las concentraciones ensayadas indujeron la formación de estas estructuras, siendo en 1/4 x CMI donde mayor porcentaje se observa, aunque las variaciones no son significativas (1-5%, figura 5). La morfología normal (control) fue la de bacilos de 1 a 4 μm , cuya frecuencia llegó casi al 100%.

En los experimentos "in vivo" también se advierte este mismo efecto, llegando la frecuencia de aparición de formas cocoides hasta casi el 95%. Sin embargo hay que matizar que si bien la frecuencia de aparición de formas bacilares típicas (1-4 μm) de *E. coli* en los controles "in vitro" fue casi del 100%, en los ensayos "in vivo" estuvo repartida al 50% entre formas cocoides (1 μm) y bacilos (1-4 μm , figura 20). Esta diferencia puede ser debida a la mayor dificultad de crecimiento de las células en la infección "in vivo", ya que los nutrientes son más escasos.

El mecanismo por el cual se producen estos cambios en la forma de las bacterias está muy directamente relacionado con el mecanismo de acción de este antimicrobiano. Como ya se indicó en la introducción, meropenem actúa inhibiendo la función de las PBPs, cuya acción es la de participar en la construcción de la pared celular (188). En el caso de *E. coli*, la mayor afinidad por la PBP2 observada por los carbapenemas es la causa de que se forman esferoplastos (61, 132, 136). Estas estructuras pueden ser también conseguidas utilizando un antimicrobiano que se una a la PBP1a o 1b, pero estos esferoplastos son rápidamente lisados al ser osmóticamente inestables. En el caso de imipenem, también se pueden ver esferoplastos con concentraciones subinhibitorias, ya que también tiene una alta afinidad por la PBP2 de *E. coli* (81, 96, 98,). Otros antimicrobianos que se unen a la PBP2 también inducen la formación de estas estructuras, como mecilinam (139, 97). Las funciones de cada PBP esencial (1a, 1b, 2 y 3) en *E. coli* han sido estudiadas por varios autores y se conocen muy bien (45). La 1a y 1b están relacionadas con la elongación de la bacteria; la PBP2 con la forma, y la 3 con la formación de septos y división de la célula. De esta manera, meropenem causa los esferoplastos al inhibir la PBP2, pero no causa lisis al ser las células estables osmóticamente. En el caso de *P. aeruginosa*, se ha comprobado que la afinidad es mayor por la PBP3 (108), lo que causa una filamentación al inhibirse la formación de septos con que se divide la célula.

La filamentación es la morfología inducida más comúnmente observada "in vitro" e

"in vivo" sobre Gram-negativos entre los β -lactámicos (22, 45, 81, 96, 97, 98, 130, 131, 133, 176, 205). Antimicrobianos como penicilina, ampicilina, cefotaxima, piperacilina y otros más actuales como ceftibuten (22) producen filamentos de hasta 50 μm , causados por la inhibición de la formación de septos y posterior división (45). En la tabla X se detallan los tipos de morfologías encontrados en *E. coli* con varios antimicrobianos β -lactámicos, así como la PBP que es preferentemente inhibida. No se observan variaciones entre los ensayos "in vivo" e "in vitro", aunque hay pocos datos para comparar.

Tabla X. Tipos de morfología de *E. coli* encontrados con algunos antimicrobianos β -lactámicos y PBP por la que tuvieron mayor afinidad.

Antimicrobiano	PBP con mayor afinidad	Morfología más común
Imipenem ("in vitro")	2	Esferoplastos
Mecilinam	2	Esferoplastos
Ampicilina	3	Filamentos
Piperacilina	3	Filamentos
Cefotaxima	3	Filamentos
Ceftibuten	3	Filamentos
Cefaloridina	1	Esferoplastos (lisis)
Cefaloridina ("in vivo")	1	No hubo células
Cefoxitina	2 y 3	Pocos filamentos
Cefazolina	3	Filamentos
Cefamandol	3	Filamentos
Cefuroxima	3	Filamentos
Cefalexina	3	Filamentos
Ampicilina	3	Filamentos
Amoxicilina	1	Esferoplastos (lisis)

B.- Con *S. aureus* se observa que los cambios morfológicos inducidos "in vitro" por las sub-CMI de meropenem no son tan concluyentes como ocurría con *E. coli*. Las frecuencias de formas anormales (aglomerados celulares $> 1 \mu\text{m}$) estuvieron alrededor del 2-5% con 1/2 y 1/4 x CMI, siendo del casi 50% con la CMI. La forma típica fue la de coco con 1 μm de diámetro, siendo su frecuencia en los controles del 100%. Se tomó este límite de diámetro al observar que las formas cocoides no sobrepasan este valor en la mitad de la división, dando a entender que por encima de este número son varias las células hijas que no

pueden separarse (132).

En los experimentos "*in vivo*" se observa el mismo patrón de morfología, siendo los porcentajes de formas anormales aproximadamente de un 7-8%, aunque en los controles también aparecen estos aglomerados en un porcentaje bajo (2%). Este último valor en los controles puede deberse, al igual que con *E. coli*, a la mayor dificultad de las células en encontrar los nutrientes necesarios para su crecimiento, lo que puede retrasar la división de las células hijas.

El mecanismo por el cual se producen estos cambios en la morfología de la bacteria es básicamente el mismo que para *E. coli*. La unión e inhibición de las PBPs del microorganismo es la causante de estos efectos, ya que se bloquean procesos enzimáticos necesarios en la síntesis de componentes de la pared. El papel de estas PBPs es distinto sin embargo en los Gram-positivos que en los Gram-negativos (73). Las PBPs 1 y 4 de *S. aureus* no parecen ser esenciales, ya que se han encontrado mutantes viables para cada una de ellas (100); sin embargo, las PBP 2 y 3 tienen una actividad esencial en la formación de septos y el grosor de la pared (100). Meropenem parece tener una alta afinidad por la PBP 2, pero no por la 3 (108). La baja frecuencia de aparición de formas anómalas (con septos incompletos) sería debido a la inhibición de esta PBP 2, ya que la 3 seguiría activa.

No existen estudios sobre la morfología "*in vitro*" o "*in vivo*" de bacterias Gram-positivas con meropenem ni con imipenem. Sin embargo, la afinidad de imipenem por la PBP 3 de *S. aureus* es mucho mayor que la de meropenem (108), lo que hace pensar que los cambios en la morfología serán más drásticos que los encontrados en este trabajo. En la tabla XI se enumeran la morfología encontrada tras la exposición de *S. aureus* a concentraciones sub o supra-CMI de varios antimicrobianos β -lactámicos. Como se puede apreciar, los patrones de morfología son bastante iguales, ya que las PBPs esenciales de este microorganismo son sólo 2, como se explicó anteriormente, pudiendo inhibirse la formación de septos o el engrosamiento de la pared celular (100).

Tabla XI. Tipos de morfología de *S. aureus* encontrados con algunos antimicrobianos β -lactámicos.

Antimicrobiano	Morfología más común
Cloxacilina	Células de 2-3 μm . Agregados celulares (132).
Cefdinir	Agregados celulares. Inhibición septos y adelgazamiento pared celular (100).
Cefaloridina	Grandes formas celulares (205).
Ampicilina	Grandes formas celulares (205).
Penicilina	Agregados celulares. Grandes formas celulares (132).
Oxacilina	Agregados celulares con septos delgados (132).
Cefazolina	Agregados celulares con septos delgados (132).

2.2.2. Ciprofloxacino

A.- En los ensayos "in vitro" frente a *E. coli*, ciprofloxacino indujo la formación de filamentos y formas elongadas. Con $1/2 \times \text{CMI}$, la mayor frecuencia se dió en formas elongadas de 4-10 μm , seguido de filamentos cortos (10-20 μm) y una pequeña cantidad de filamentos largos ($> 30 \mu\text{m}$, figura 5B). Sin embargo, con $1/4 \times \text{CMI}$ la frecuencia más alta fue principalmente la de formas elongadas de 4-10 μm (casi un 70%), siendo los filamentos tanto largos como cortos menos frecuentes que con la anterior concentración. Con la CMI, las frecuencias fueron aproximadamente las mismas que con $1/2 \times \text{CMI}$, aunque se encontraron el doble de filamentos largos. Los controles mostraron una morfología típica de bacilos de 1-3 μm , con una pequeña fracción de elongados (4-10 μm) que corresponden a bacterias en fase de división.

Con el modelo "in vivo" los resultados son significativamente diferentes a los encontrados "in vitro". Como se comentó con meropenem, los controles mostraron una morfología cocoide en un 45-50%, tal vez debido a la mayor dificultad en el crecimiento de estos microorganismos (figura 20)(132). Aun así, ciprofloxacino indujo la elongación de estas formas celulares, bajando la frecuencia de cocos hasta el 30% y encontrándose formas elongadas en un 15-17%, frente a un 1-2% del control. No obstante, no se observaron filamentos cortos ni largos.

El mecanismo por el cual se producen estas formas elongadas no puede ser el mismo que en el caso de los β -lactámicos, ya que las quinolonas no se unen e inhiben a las PBPs. Las quinolonas actúan inhibiendo la actividad de superenrollamiento de la ADN-girasa, como ya se indicó en la introducción, aunque no se conozcan bien los lugares específicos de unión (ADN o girasa). La muerte celular se produciría mediante la activación del mecanismo SOS de reparación del ADN y la producción de exonucleasas, aunque en ciprofloxacino y norfloxacino parece haber otro mecanismo que no requiere la síntesis de ARN y proteínas (141). La variación en la morfología parece tener también una relación con el sistema SOS de reparación del ADN. Según Diver y cols. (50), la inducción de este sistema induciría la producción de enzimas inhibitoras de la división celular, vía activación de los genes *Sul A* y *B*, observándose como resultado la elongación de la célula. Esto sería un efecto no directamente relacionado con la muerte celular, ya que según observaron, la tasa bactericida de ciprofloxacino era principalmente inhibida con cloranfenicol a concentraciones donde los filamentos eran cortos. Además, tras 24 minutos de exposición, los microorganismos no eran ya viables, mientras que la filamentación comenzaba después de 1 hora de tratamiento.

Ese mismo trabajo y otros (50, 87, 130, 131) se ha observado la inducción de filamentos por ciprofloxacino y otras quinolonas. En algunos de ellos se utilizaban concentraciones sub-CMI mientras que en otros las bacterias se observaban en fase de EPA, tras una exposición a concentraciones iguales o superiores a la CMI. No hubo diferencias sin embargo en el tipo de morfología encontrada, lo que indicaría que el EPA se debe a una acción residual de una exposición previa al antimicrobiano (81).

Por otro lado, al exponer *E. coli* a la acción de altas concentraciones de ciprofloxacino, Diver y cols. (50) encontraron que la filamentación era muy baja, hallándose la más alta frecuencia de filamentos en concentraciones cercanas a la CMI. Esto sería debido a que las quinolonas a altas concentraciones inhiben la síntesis de ARN, con lo que no se podrían expresar los genes *Sul A* y *B* responsables de la elongación al inhibir la división. Existiría, al igual que con la acción bactericida, un "efecto paradójico" en la inducción de filamentación (50). La inducción de cambios morfológicos de quinolonas "in vivo" no ha sido estudiada hasta el momento.

En cuanto a la forma de las células encontrada en controles "in vivo", este microorganismo creció con una morfología normal de bacilo de 1-3 μm en controles hechos por Zak y cols. (205) o Ryan and Monsey (176), al estudiar la acción de ampicilina en un modelo en conejos y de varias cefalosporinas en ratones. Sin embargo, se han publicado casos en los que la morfología típica de varios microorganismos ha cambiado en infecciones en

humanos que no habían sido tratados con antimicrobianos (125).

B.- Con *S. aureus*, los ensayos "in vitro" muestran una inducción de aglomerados celulares iguales a los encontrados con meropenem, si bien su frecuencia es mayor (figura 6B). Con la CMI, los valores fueron aproximadamente los mismos que para el β -lactámico, pero las frecuencias observadas para 1/4 y sobre todo con 1/2 x CMI son claramente superiores.

"In vivo" también se puede observar una mayor frecuencia de aglomerados celulares en comparación con meropenem (figura 21), siendo este tipo de morfología el doble que en ese antimicrobiano. No obstante, este valor puede ser considerado como bajo ya que no pasa del 15%. Sí cabe subrayar que en los controles se encontró una pequeña frecuencia de formas anormales (2-3%), que pueden ser debidas a la mayor lentitud en la división de las células en el lugar de la infección, al ser medio menos rico en nutrientes.

La inducción de estos cambios en la morfología de *S. aureus* tiene probablemente el mismo mecanismo que en el caso de *E. coli*: la inducción de genes que inhiben la división por parte del sistema SOS de reparación de ADN. No obstante, esta teoría no ha sido investigada ni confirmada, aunque los efectos que se observan son realmente los mismos que los que ocurren en *E. coli*: la formación de aglomerados que contienen células hijas que no han podido separarse. No se conocen los genes implicados ni parece haberse aislado los productos de estos genes.

Solamente se ha publicado un estudio con ciprofloxacino y *S. aureus* (80), pero en ese caso la morfología se estudió tras una exposición a concentraciones superiores a la CMI (en fase de EPA). Se encontraron frecuencias de hasta un 80% de formas entre 0,8 y 1,2 μm . Frente a *S. aureus* meticilin-resistentes se observaron las mismas frecuencias con exposición continua a ciprofloxacino (81). Esto sugiere, como ya se comentó anteriormente, que los cambios morfológicos que se pueden observar en fase de EPA son prácticamente los mismos que los que se ven con concentraciones sub-CMI, ya que están intimamente relacionados con el mecanismo de acción del antimicrobiano (81).

3. ACTIVIDAD DE MEROPENEM Y CIPROFLOXACINO EN CURVAS DE LETALIDAD "IN VIVO"

La finalidad de estos experimentos "in vivo" son diferentes para cada antimicrobiano, como ya se ha comentado en el apartado de métodos. En el caso de meropenem, al carecer de un EPA significativo, las curvas de letalidad "in vivo" se centraron en la comparación de dos regímenes de dosificación distintos en los que el parámetro farmacocinético $T > CMI$ era diferente. Con ciprofloxacin, el EPA era significativamente largo como para comparar dos dosificaciones en las que una de ellas tenía en cuenta el EPA.

3.1. MEROPENEM

Con este antimicrobiano, los resultados con los dos microorganismos ensayados han sido diferentes. Por un lado, con *S. aureus* se consiguió el mismo efecto terapéutico con las dos dosificaciones administradas (figura 16, tabla VI): solo hubo una variación de 0,2 log₁₀ UFC/muslo entre las dos curvas. Con *E. coli* sin embargo, el tratamiento A (20 mg/kg cada 3 h.) fue más eficaz que el B (40 mg/kg cada 6 h.), con una diferencia entre los dos de 1,1 log₁₀ UFC/muslo. El efecto bactericida fue de aproximadamente de 2,5 log₁₀ UFC/muslo, excepto en el caso de *E. coli* con el tratamiento B.

Los tiempos sobre la CMI fueron distintos en los dos tratamientos: en el A se mantuvieron durante todo el experimento (10 h.), mientras que en el B descendían de la CMI en la hora 5 o 6 aproximadamente. Además, las concentraciones máximas también fueron diferentes, siendo la del B mayor que la del A. En el caso de *E. coli*, parece que el $T > CMI$ es el parámetro que se relaciona con la eficacia, pero con *S. aureus* no parece tener relación, ya que los tratamientos rinden igual efecto bactericida. De todas formas, también puede jugar un papel importante la concentración máxima. Sin embargo, las curvas mostrarían entonces un efecto inicial mayor en las primeras horas, lo cual no se observa en la figura 16A y B.

Los experimentos realizados por otros investigadores difieren en la metodología utilizada. Aunque la mayoría utiliza el modelo de infección en ratón neutropénico, los grupos experimentales son más que los empleados en este trabajo. Vogelmann y cols. (197) estudiaron la correlación existente entre la actividad de varios antimicrobianos y sus parámetros farmacocinéticos al igual que este trabajo, pero utilizando una mayor gama de dosificaciones en un periodo más largo (hasta 24 h.), lo cual les permitía realizar un análisis multilineal de regresión. Los antimicrobianos β -lactámicos analizados se correlacionaban bien con el tiempo

sobre la CMI, aunque ningún carbapenema fue ensayado (tabla XII). Este mismo proceso fue llevado a cabo por Craig y cols. (38) con algunos otros antimicrobianos de este mismo grupo y de los aminoglicósidos (gentamicina y netilmicina), incluyéndose entre los primeros a imipenem. De nuevo el parámetro asociado fue el tiempo sobre la CMI. Por otro lado, Fluckiger y cols. (66) utilizaron también el modelo de infección en ratón neutropénico para estudiar este mismo efecto con imipenem, pero se realizó simulando la farmacocinética humana mediante posteriores administraciones que mantengan los niveles más tiempo sobre la CMI. Los resultados fueron iguales, siendo $T > CMI$ el parámetro asociado a la mayor actividad frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*. Otros trabajos parecen corroborar estos datos (67).

Sin embargo, de nuevo Craig y cols. observaron en otro ensayo "in vivo" (42) que para los carbapenemas la actividad era menos dependiente de este parámetro farmacocinético que en el caso de penicilinas y cefalosporinas. Tal vez sea la inducción de EPA de este grupo de antimicrobianos el hecho que les diferencie de los demás β -lactámicos en cuanto a esta menor dependencia de $T > CMI$, ya que este retraso en el crecimiento impediría que los microorganismos recrecieran cuando los niveles en suero están bajo la CMI.

Tabla XII. Parámetros farmacocinéticos asociados a la actividad de varios antimicrobianos frente a microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos.

Antimicrobiano	Microorganismo	Parámetro farmacocinético asociado	Ref.
Imipenem	<i>E. coli</i>	Tiempo $>$ CMI	38, 66
	<i>P. aeruginosa</i>	Tiempo $>$ CMI	66
Cefazolina	<i>E. coli</i>	Tiempo $>$ CMI	38, 197
	<i>S. aureus</i>	Tiempo $>$ CMI	197
Ceftazidima	<i>P. aeruginosa</i>	Tiempo $>$ CMI	38
Cefoperazona	<i>P. aeruginosa</i>	Tiempo $>$ CMI	38
Ticarcilina	<i>E. coli</i>	Tiempo $>$ CMI	38
Piperacilina	<i>P. aeruginosa</i>	Tiempo $>$ CMI	115
Ciprofloxacino	<i>K. pneumoniae</i>	Log ABC	173
Gentamicina	<i>E. coli</i>	Log ABC	38, 197
Netilmicina	<i>P. aeruginosa</i>	Log ABC	38
Eritromicina	<i>S. pneumoniae</i>	Tiempo $>$ CMI y Log AUC	197

3.2. CIPROFLOXACINO

Los ensayos "in vivo" llevados a cabo con ciprofloxacino indican que el EPA de este antimicrobiano es lo suficientemente largo como para cubrir el tiempo que los niveles en suero están bajo la CMI. En la figura 17 y la tabla VI observamos que las curvas de letalidad son paralelas, aunque para *E. coli* se ve un aumento brusco del tratamiento B en la hora 8. Sin embargo, en la hora 10 los recuentos son muy similares a los encontrados con el tratamiento A, estando los valores de efecto bactericida en torno a los $3,5 \log_{10}$ UFC/muslo. Para *S. aureus* las reducciones en el crecimiento fueron menores, alrededor de $1,8 \log_{10}$ UFC/muslo, lo cual es debido a la menor actividad de este antimicrobiano frente a esta cepa.

En estos resultados se muestra que el coste de antimicrobiano en el tratamiento A puede ser la mitad sin que la actividad frente a estas dos cepas se pierda significativamente. En este caso, los largos EPA encontrados "in vivo" con ciprofloxacino (3,1 y 1,9 para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente) son muy similares a los tiempos que los niveles en suero se mantuvieron sobre la CMI de estos microorganismos (tabla IV), lo que permite reducir la dosis total a la mitad. De todas formas, se necesitarían más ensayos con mayor número de administraciones en un tiempo mayor (tratamientos largos) para comprobar si estos resultados son válidos.

No se han llevado a cabo experimentos similares a este con ciprofloxacino. Por otro lado, otros investigadores han llevado a cabo ensayos para estudiar la relación entre la actividad y distintos parámetros farmacocinéticos de ciprofloxacino y otras quinolonas, teniendo en cuenta que el EPA ayudaría a cubrir periodos interdosis en dosificaciones intermitentes. Utilizando otros modelos animales (septicemia y neumonia en ratas neutropénicas), Roosendaal y cols. (172, 173), han encontrado que la actividad de este antimicrobiano es dependiente de la dosis total administrada, sea cual sea la frecuencia de administración; una alta eficacia se puede observar en estos estudios con dosificaciones en las que el tiempo sobre la CMI solo cubre un 25% del tiempo inter-dosis, siendo el EPA el que impide el crecimiento en el restante 75%. De todas formas, se necesitan un mayor número de ensayos con quinolonas para demostrar estos resultados con un mayor número de microorganismos.

4. LOS PARAMETROS FARMACODINAMICOS EN LOS REGIMENES DE DOSIFICACION

En el estudio de los nuevos antimicrobianos se han de tener en cuenta todos los

parámetros que pueden influir tanto en su actividad como en otros factores como toxicidad, coste económico, etc. Hasta hace poco tiempo sin embargo, la actividad de una sustancia solamente era medida y tenida en cuenta casi exclusivamente por su CMI. La eficacia se creía adecuada cuando se alcanzaba una concentración superior a este factor durante el mayor tiempo posible (39, 134). Por otro lado, pacientes que tenían problemas con la toxicidad de algunos antimicrobianos presentaban un gran obstáculo a la terapéutica ya que se pensaba que la actividad de estos compuestos no era óptima.

Desde hace unos quince años hasta nuestros días se vienen investigando diversos fenómenos que tienen una relación muy directa con la actividad de los antimicrobianos en la clínica. Las técnicas utilizadas en principio para estudiarlos han ido purificándose y estandarizándose progresivamente, a la vez que han aparecido otras más nuevas que han corroborado los datos ya encontrados. A las investigaciones "in vitro" han seguido los estudios "in vivo" que han corroborado bastante bien los datos observados. Todos estos "nuevos efectos" están siendo incorporados en el estudio de nuevas sustancias; al mismo tiempo, el conocimiento de su acción con las sustancias ya conocidas y ampliamente utilizadas da un nuevo enfoque a la quimioterapia.

Cada fenómeno estudiado en este trabajo, así como otros relacionados, tienen un efecto por sí solos en la acción de los antimicrobianos sobre las bacterias, aunque posteriormente su observación se encuentre muy estrechamente relacionada con los otros. De la comprensión de la importancia de cada uno de ellos depende la visión global que podamos tener de la acción de estas sustancias.

4.1. EFECTO POSTANTIBIOTICO

El conocimiento del EPA de un antimicrobiano puede ayudar en gran medida al establecimiento de un tipo de dosificación que sea eficiente frente a determinados microorganismos. Sustancias que induzcan en general un EPA significativamente alto podrían ser administradas de una forma menos continua sin miedo a perder efectividad, lo que representaría un ahorro en todas las facetas de la clínica (toxicidad para el paciente, económico, etc). Desde este punto de vista, los aminoglicósidos, las quinolonas y los macrólidos serían las sustancias que requerirían una más espaciada dosificación, ya que su EPA frente a la mayoría de los microorganismos es alto (39). Los β -lactámicos no muestran un significativo EPA con casi ninguna bacteria (excepto con algunos Gram-positivos), lo que induce a pensar que su administración debe ser lo más continua posible en orden a no perder eficacia, a menos que otros parámetros farmacodinámicos suplan este defecto. De entre este

grupo de antimicrobianos, los carbapenemas son los únicos que podrían espaciar su administración, ya que se ha demostrado un EPA significativo frente a bacterias Gram-negativas.

Una de las más frecuentes prácticas en la clínica es la de la utilización de **combinaciones de antimicrobianos** para cubrir un amplio espectro de microorganismos. La coadministración de un β -lactámico con un aminoglicósido es una de las combinaciones más eficaces en algunas infecciones. Algunos investigadores (92, 201) han demostrado tanto "in vitro" como "in vivo" que antimicrobianos que por sí solos inducen EPA pueden, cuando son utilizados conjuntamente, mostrar un efecto tanto aditivo (suma de EPA) como indiferente (no interferencia entre ellos). Por ejemplo, imipenem y tobramicina muestran un 79-85 % más de EPA que el mayor de los dos frente a *P. aeruginosa*, pero no afecta la duración de éste cuando es administrado junto con gentamicina frente a *E. coli*, ya que no muestra un EPA significativo frente a esta cepa. Estos estudios deberían ser ampliados con la realización de tratamientos largos (con varias dosis) en modelos animales (92, 115).

En el caso de **meropenem**, al ser un antimicrobiano no comercializado, no existen unos regímenes de administración definidos. Sin embargo, según algunos estudios farmacocinéticos (12), una dosis de 1000 mg puede mantener los niveles en suero por encima de 1 mg/l (superior a la CMI de muchos microorganismos) durante un período de 6 horas. Con una dosis de 250 mg, este período sería de 3 horas. Dado que este antimicrobiano no muestra un EPA significativo frente a ninguna de las tres cepas ensayadas en este trabajo y otros (160), la inclusión del estudio del efecto postantibiótico en la dosificación de meropenem apoyaría una administración lo más frecuente posible para mantener sus niveles en suero por encima de la CMI durante el tratamiento. No obstante, los datos obtenidos "in vitro" por algunos autores con algunas cepas (151) apoyarían un más amplio estudio de este efecto con este antimicrobiano. En la coadministración con otros antimicrobianos, como los aminoglicósidos, meropenem no aumentaría el EPA de éstos, ya que con imipenem no parece que exista sinergismo (92).

Ciprofloxacino es una sustancia muy utilizada en la quimioterapia antimicrobiana. La dosis depende del tipo de infección, pero varía entre 200-1000 mg por día. La administración suele ser 2 veces diarias, aunque en muchos casos se recomienda la dosis única cuando existen problemas (renales, avanzada edad). El EPA de este antimicrobiano impediría en estos casos una pérdida de eficacia; además, apoyaría una dosificación única diaria, aunque en las infecciones graves sería recomendable mantener las 2 dosis diarias, dependiendo del microorganismo causante.

4.2. FARMACOCINETICA

Como se ha demostrado en este y otros trabajos (66, 197), existe una relación entre la actividad de un antimicrobiano y ciertos parámetros farmacocinéticos. Esta relación es debida en parte a las características particulares de cada antimicrobiano: su mecanismo de acción, estructura química, metabolismo, etc.

Parece haber también una correlación entre estos parámetros y la duración del EPA (39); más aún, esta relación parece ser idéntica a la encontrada con la actividad del antimicrobiano. De esta manera, un antimicrobiano cuya actividad dependa de la dosis total y posea EPA, también tendrá un EPA mayor cuanto mayor sea la dosis total. Así, si aumentamos la dosis, estamos aumentando la actividad y el EPA, maximizando su efectividad.

Si bien la relación farmacocinética-actividad es característica de cada antimicrobiano, existe una correlación entre ciertos datos farmacocinéticos y los grandes grupos de antimicrobianos. Los β -lactámicos parecen estar muy relacionados con el tiempo en que se mantienen sobre la CMI en suero, como ya hemos visto (66, 99, 197). Sin embargo, los **carbapenemas** parecen tener una menor dependencia de este parámetro que las penicilinas o cefalosporinas (42). **Meropenem** tendría mayor eficacia entonces si fuera administrado de forma continua, ya que se maximizaría el tiempo sobre la CMI y su actividad. Sin embargo, en nuestros experimentos se observa que con *S. aureus* hay una buena actividad aun cuando el tiempo sobre la CMI es distinto en los dos tratamientos (figura 16). Esto podría ser debido a esa menor dependencia de este parámetro dentro de los β -lactámicos. Apoyando esta idea se han observado algunos éxitos terapéuticos con imipenem administrado intermitentemente en pacientes neutropénicos (123). La discusión de la posible dosificación intermitente de los carbapenemas es hoy en día un tema de la máxima actualidad (58, 99).

Ciprofloxacino por el contrario, parece tener una relación con la dosis total (ABC) y la concentración máxima ($C_{máx}$) (4, 19, 30, 48, 76, 120, 149, 197, 209). De esta forma, este antimicrobiano podría ser administrado mas espaciadamente si aumentáramos la dosis (500 mg/día en vez de 250 mg/2 veces día) (193, 194), ya que su actividad sería mayor. A su vez, el EPA aumentaría al ser también dependiente de la dosis total, lo que permitiría cubrir mejor el espacio entre dosis (16).

4.3. CONCENTRACIONES SUB-CMI

El efecto de estas concentraciones es impotente, como se ha dicho anteriormente, debido a que siempre se encuentran tras la administración de un antimicrobiano. Desde este punto de vista, su posible acción ayudaría a que los microorganismos no recrecieran cuando los niveles descienden de la CMI.

Los efectos sobre bacterias en fase de EPA (ESC EPA), es un fenómeno que responde a la realidad que se encuentra "in vivo", y sus valores son significativamente mayores que los observados sobre bacterias en crecimiento exponencial (160). Muchos antimicrobianos de todas las clases han mostrado valores muy significativos de ESC EPA tanto "in vitro" como "in vivo" frente a una gran variedad de microorganismos. De nuevo parece que existe una relación con la actividad (160), de tal forma que las clases de antimicrobianos más activas (aminoglicósidos, quinolonas, macrólidos) tendrían unos efectos significativamente mayores que las menos bactericidas (β -lactámicos). **Meropenem** induce un ESC EPA relativamente grande frente a *P. aeruginosa* (160) y *S. aureus* (figura 2), pero no frente a *E. coli* (figura 1). Se necesitarían más investigaciones para confrontar estos datos. De todas formas, no alcanzan valores como los de los aminoglicósidos (10-22 h.) (33), lo que indicaría que este no debe ser un parámetro que apoye la dosificación intermitente, al menos no con todos los microorganismos. **Ciprofloxacino** sí muestra unos valores significativamente altos como para que su efecto sea apreciable tras la administración de un antimicrobiano. Junto con el EPA cubrirían de forma eficaz el período entre dosis.

4.4. CAMBIOS MORFOLOGICOS

La morfología bacteriana tiene un efecto indirecto sobre la muerte de los microorganismos. La inducción de formas anormales (aglomerados, esferoplastos, filamentos) deben influir en la función de las células polimorfonucleares (PMNs), alterando sus funciones de fagocitosis. Los **filamentos**, observados con muchos antimicrobianos (ciprofloxacino y β -lactámicos), parecen oponer una barrera a la fagocitosis al medir hasta 50 veces el tamaño de un bacilo normal. Sin embargo, algunas observaciones apuntan a que es todo lo contrario: se fagocitan incluso mejor. Lorian y cols. (126, 128) encontraron que *E. coli* y *P. aeruginosa* eran más eficientemente fagocitados en forma de filamentos, ya que es más rápido encontrar un filamento de 30 o 40 células unidas que 30 o 40 bacilos aislados. Mediante un modelo estadístico demostraron que en términos de probabilidades, es más probable encontrar un filamento que el mismo número de células aisladas (133). El tamaño del filamento no parece ser un problema para los PMNs, según los estudios microcinematográficos hechos por estos

autores.

Los **esferoplastos** no han sido estudiados en su relación con la fagocitosis. De todas formas, no parece que tengan ninguna relación con ella, ya que son células aisladas con la misma probabilidad de encontrarse con los PMNs que las células normales. Sin embargo, tras su ingestión, serían mejor digeridos al tener la pared celular muy debilitada. Los **aglomerados celulares** encontrados con *S. aureus* serían por el contrario un impedimento tras la fagocitosis, puesto que las células no separadas que estuvieran en el centro estarían protegidas de la digestión enzimática y sobrevivirían más tiempo (132, 133).

Según estos patrones, **meropenem** no alteraría la fagocitosis de *E. coli* sino la digestión intrafagosómica, mientras que **ciprofloxacino** podría incrementar la fagocitosis de este microorganismo. Con *S. aureus*, los dos antimicrobianos no tendrían influencia en la fagocitosis, y tal vez ejercerían un efecto que permitiría a esta bacteria sobrevivir más tiempo dentro de la célula.

Sin embargo, hay otro efecto que tendría una relación muy directa con este tema: la **actividad intracelular** de ciertos antimicrobianos. Tanto ciprofloxacino como meropenem parecen tener una buena penetración y acumulación dentro de los PMNs, así como alta actividad dentro de los leucocitos, macrófagos y monocitos (26, 44, 57), lo que ayudaría a una mejor acción contra las células ya fagocitadas. No obstante, se necesitan más investigaciones sobre estos efectos para una posible aplicación en la dosificación de estos antimicrobianos.

4.5. OTRAS CONSIDERACIONES SOBRE LOS REGIMENES DE DOSIFICACION

Hay otros efectos que podrían ser incluidos en el diseño de nuevos regímenes de dosificación, tales como:

- efectos de las sub-CMI sobre la virulencia
- efectos de las sub-CMI sobre la adhesión
- posible efecto refractario de algunos antimicrobianos

Estos estudios no son recientes y han dado resultados interesantes. Sin embargo, son más bien fenómenos que aparecen durante el tratamiento y que no afectarían a la dosificación en sí.

Fuera de los efectos de la farmacodinámica, el estado de los pacientes es uno de los mayores impedimentos en la correcta administración de los antimicrobianos. La insuficiencia renal o la toxicidad de estas sustancias hacen que las administraciones tengan que ser espaciadas e incluso suspendidas para no causar efectos secundarios graves. Todos los parámetros indicados en el punto anterior influirían de forma favorable en un espaciamiento de la dosis, lo que reduciría la pérdida de eficacia. Ya que las defensas del huésped son parte muy importante del éxito de un tratamiento terapéutico, habría que considerar a una parte de los pacientes que no poseen capacidad defensiva debido a sus enfermedades (tumores, SIDA, etc.). La dosificación debería ser diferente según el estado del sistema inmunitario.

A) Pacientes inmunocompetentes: la posible acción de los antimicrobianos incrementando la fagocitosis y digestión de los microorganismos sería una importante baza en este tipo de pacientes, puesto que disminuiría el riesgo de recrecimiento en periodo entre dosis. La dosificación intermitente podría ser aplicada ya que las defensas ayudarían a cubrir todo el tiempo que los niveles en suero no superan la CMI. El EPA junto con la acción de sub-CMI alargarían la acción de estos antimicrobianos y no se perdería eficacia. No obstante, siempre habría que analizar todos los factores importantes que favorecen esta dosificación para evitar el fallo terapéutico o la aparición de resistencias. En estos factores no sólo están lo que se han comentado, sino otros que pueden influir en la buena respuesta del antimicrobiano como la mayor o menor oxigenación del tejido infectado, pH, etc.

B) Pacientes inmunocomprometidos: fenómenos como el PALE (mayor fagocitosis tras la acción del antimicrobiano) no tendrían efecto en estos pacientes. Algunos estudios muestran que en los pacientes inmunodeprimidos, los intervalos de dosificación comprenderían tiempos más cortos, que podrían abarcar la suma del EPA más el tiempo en que se mantiene el antimicrobiano sobre la CMI (38, 77, 135, 197), pero una dosificación al día sería seguramente poco eficaz en estos pacientes. La combinación de antimicrobianos es una práctica muy utilizada en estos casos, y habría que estudiar si el EPA estaría incrementado tras la administración de dos sustancias inductoras de este efecto (92).

VII. Conclusiones

Una vez evaluados cada uno de los efectos farmacodinámicos por separado, así como sus interrelaciones y aplicaciones clínicas, podemos extraer de este trabajo las siguientes conclusiones:

- 1^a) Los EPA "in vitro" de meropenem frente a *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* fueron muy poco significativos, alcanzándose incluso valores negativos. Con ciprofloxacino, estos valores fueron altos, con una media de 2,6 h. frente a las tres cepas anteriores.
- 2^a) Los EPA "in vivo" de meropenem fueron, frente a las tres cepas anteriores y al igual que "in vitro", no significativos ($> 0,5$ h.). Ciprofloxacino mostró, también al igual que "in vitro", valores altos (media de 2,3 h.).
- 3^a) Las diferencias estadísticas entre el EPA de los dos antimicrobianos fueron significativas tanto "in vitro" como "in vivo" ($p < 0,01$ y $0,001$ respectivamente). No hubo diferencias sin embargo al comparar el EPA "in vitro" con el "in vivo", tanto para cada antimicrobiano por separado como en general ($p = 0,94$).
- 4^a) Tanto el método de dilución empleado en el EPA "in vitro" como el modelo de infección en muslo de ratón neutropénico utilizado "in vivo" fueron sencillos en el uso, y su amplia utilización por otros investigadores permite una comparación veraz de los resultados.
- 5^a) Los efectos de concentraciones sub-CMI en el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* en fase de EPA fue grande en el caso de ciprofloxacino ($> 3,5$ h. con $1/2 \times$ CMI); con meropenem, sólo fue apreciable frente a *S. aureus* (2,85 h. con $1/2 \times$ CMI).
- 6^a) La morfología de *E. coli* y *S. aureus* se vio alterada por los dos antimicrobianos de igual forma "in vitro" como "in vivo". Meropenem indujo la formación de esferoplastos en *E. coli*, mientras que ciprofloxacino indujo filamentación. *S. aureus* creció formando aglomerados celulares en presencia de los dos antimicrobianos.
- 7^a) En las curvas de letalidad "in vivo", meropenem tuvo la misma eficacia cuando fue administrado en forma continua o en dosis única frente a *S. aureus*, siendo más eficaz el primer tratamiento en el caso de *E. coli*. Con ciprofloxacino, el tratamiento que incluía el EPA tuvo al final del ensayo la misma actividad frente a las dos cepas que el que mantenía los niveles por encima de la CMI.

-
- 8^a) Los parámetros farmacodinámicos estudiados en este y otros trabajos apuntan hacia una dosificación continua de meropenem para no perder eficacia, ya que sus valores son muy bajos, aunque hay estudios que demuestran un mayor peso del EPA en este grupo de antimicrobianos que en otros β -lactámicos. Ciprofloxacino sin embargo si permitiría un mayor período entre dosis sin perder eficacia, ya que el EPA y los ECS EPA son significativamente altos como para cubrirlos.

VIII. Bibliografía

- 1) Adinolfi L.E., Bonventre P.F. 1988. Enhanced phagocytosis, killing and serum sensitivity of *E. coli* and *S. aureus* treated with sub-MICs of imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32: 1012-18.
- 2) Ahlstedt S. 1981. The antibacterial effects of low concentrations of antibiotics and host-defense factors: a review. *J. Antimicrob. Chemother.*, 8 (Suppl. C): 59-70.
- 3) Andreana A., Perna P., Utili R., Dilillo M., Ruggiero G. 1984. Increased phagocytosis and killing of *E. coli* treated with subinhibitory concentrations of cefamandole and gentamicin in isolated rat livers. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 25: 182-186.
- 4) Bakker-Woudenberg I.A.J.M., Roosendaal R. 1988. Impact of dosage regimens on the efficacy of antibiotics in the immunocompromised host. *J. Antimicrob. Chemother.*, 21: 145-147.
- 5) Baquero F., Culebras E., Patron C., Perez-Díaz J.C., Medrano J.C., Vicente F. 1986. Postantibiotic effect of imipenem on gram positive and gram negative microorganisms. *J. Antimicrob. Chemother.* 18(Suppl.E): 47-59.
- 6) Baquero F. 1991. Aspectos generales de los antibióticos antimicrobianos. En: Plan de formación en enfermedades infecciosas. Módulo III: Antimicrobianos, Ed. Médica Internacional S.A., pp. 11-40.
- 7) Barry A.L., Jones R.N., Thornsberry C., Ayers L.W., Gerlach E.H. Sommers H.M. 1984. Antibacterial activities of ciprofloxacin, norfloxacin, oxolonic acid, cinoxacin and nalidixic acid. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 25: 633-637.
- 8) Barry A.L., Gardiner R.V., Packer R.R. 1987. Bactericidal activities of ten different fluorquinolones against selected Enterobacteriaceae. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 6: 81-83.
- 9) Barza M. 1976. The effects of protein-binding on distribution of antibiotics and the problem of continuous versus intermittent infusions, including a review of some controversial aspects. *Infection*, 4(Nº2): s144-s148.
- 10) Barza M. 1978. A critique of animal models in antibiotic research. *Scand. J. Infect. Dis.*, 14(Supp.): 109-117.
- 11) Barza M., Cuchural G. 1985. General principles of tissue penetration. *J. Antimicrob. Chemother.*, 15(Supp.A): 59-75.
- 12) Bax R.P., Bastain W., Featherstone A., Wilkinson D.M., Hutchinson M., Haworth S.J. 1989. The pharmacokinetics of meropenem in volunteers. *J. Antimicrob. Chemother.*, 24(Supp.A): 308-11.
- 13) Beam T.R. 1984. A critical appraisal of the role of animal models of infection for assessing antimicrobial activity. *Antimicrob. Newsletter*, 1: 67-76.
- 14) Bennett S.V., Craig W.A. 1985. Postantibiotics effects. *J. Antimicrob. Chemother.*,

- 15(Supp.A): 37-46.
- 15) Bergan T., Carlsen I.B., Fuglesang J.E. 1980. An in vitro model for monitoring bacterial responses to antibiotic agents under simulated in vivo conditions. *Infection*, 8: 96-102.
 - 16) Bergan T. 1981. Pharmacokinetics of tissue penetration of antibiotics. *Rev. Infect. Dis.*, 3: 45-66.
 - 17) Bergan T. 1988. Pharmacokinetics of fluorinated quinolones. En: *The quinolones*, Ed. Andriole VT, Academic Press, London, pp. 119-154.
 - 18) Bergan T., Dalhoff A., Rohwedder R. 1988. Pharmacokinetics of ciprofloxacin. *Infection*, 16(Suppl.1): 3-13.
 - 19) Bergeron M.G., Beauchamp D., Poirier A., Bastille. 1981. Continuous versus intermittent administration of antimicrobial agents: tissue penetration and efficacy in vivo. *Rev. Infect. Dis.*, 3: 84-97.
 - 20) Bigger J.W. 1944. The bactericidal action of penicillin on *Staphylococcus pyogenes*. *J. Med. Sci.*, 227: 533-568.
 - 21) Blaser J., Stone B.B., Groner M.C., Zinner S.H. 1987. Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 31: 1054-1060.
 - 22) Braga P.C., Piatti G. 1993. Kinetics of filamentation of *E. coli* induced by different sub-MICs of ceftibuten at different times. *Chemotherapy*, 39: 272-77.
 - 23) Bryan L.E., Bedard J. 1991. Impermeability to quinolones in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 10: 232-239.
 - 24) Bryan L.E., Godfrey A.J. 1991. β -lactam antibiotics: mode of action and bacterial resistance. En: *Antibiotics in laboratory medicine*, 3^a ed., Ed. Lorian V., Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 599-664.
 - 25) Bundtzen R.W., Gerber A.V., Cohn D.L., Craig W.A. 1981. Postantibiotic suppression of bacterial growth. *Rev. Infect. Dis.*, 3: 28-37.
 - 26) Burgaleta C., Moreno T., Loza E. 1989. Activity of ciprofloxacin against *E. coli* phagocytosed by monocytes and macrophages. *J. Antimicrob. Chemother*, 23: 460-62.
 - 27) Burnham J.C. 1988. Mediation by enoxacin of adherence of *Escherichia coli* to uroepithelial cells. *Rev. Infec. Dis.*, S-175.
 - 28) Bustamante C.I., Drusano G.L., Tatem B.A., Standiford H.C. 1984. Postantibiotic effect of imipenem on *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26: 678-682.
 - 29) Campoli-Richards D.M., Monk J.P., Price A., Benfield P., Todd P.A., Ward A. 1988. Ciprofloxacin: Una revisión de la actividad antibacteriana, propiedades

- farmacocinéticas y uso terapéutico. *Drugs* (Reprint), 35: 373-447.
- 30) Carbon C. 1990. Significance of tissue levels for prediction of antibiotic efficacy and determination of dosage. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 9: 510-516.
 - 31) Cars O., Ogren S. 1981. A microtechnique for the determination of antibiotics in muscle. *J. Antimicrob. Chemother.*, 8: 39-48.
 - 32) Cars O., Craig W.A. 1991. Pharmacodynamics of antibiotics-consequences for dosing. General discussion on antibiotic dosing. *Scand. J. Infect. Dis.*, 74(Supp.): 282-283.
 - 33) Cars O., Odenholt-Tornqvist I. 1993. The postantibiotic sub-MIC effect in vitro and in vivo. *J. Antimicrob. Chemother.*, 31(Supp.D): 159-166
 - 34) Chin N.X., Neu H.C. 1987. Postantibiotic suppressive effect effect of ciprofloxacin against Gram positive and Gram negative bacteria. *Am. J. Med.*, 82(Suppl.4A): 58-62.
 - 35) Chisholm G.D., Smith C.B., Waterworth P.M., Calman. 1976. Factors influencing the distribution of antibacterial agents in interstitial fluid: molecular size and protein binding. *Infection*, 4: s123-s127.
 - 36) Cleeland R., Grunberg E. 1980. Laboratory evaluation of new antibiotics in vitro and in experimental animal infections. En: *Antibiotics in laboratory medicine*, 1ª ed., Ed. Lorian V., Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 506-548.
 - 37) Craig W.A. 1976. Tissue binding of antimicrobials: a brief review. *Infection*, 4: 160-164.
 - 38) Craig W.A., Leggett J., Totsuka K., Vogelmann B. 1988. Parámetros farmacocinéticos claves de la eficacia antibiótica en infecciones animales experimentales. *J. Drug Dev.*, 1(Supp.3): 7-15.
 - 39) Craig W.A., Gudmundsson S. 1991. The postantibiotic effect. En: *Antibiotics in laboratory medicine*, 3ª ed., Ed. Lorian V., Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 403-431.
 - 40) Craig W.A., Ebert S.C. 1992. Continuous infusion of β -lactams antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36: 2577-83.
 - 41) Craig W.A.. 1993. Postantibiotic effects in experimental infection models: relationship to in vitro phenomena and to treatment of infections in man. *J. Antimicrob. Chemother.*, 31(Supp.D): 149-158.
 - 42) Craig W.A., Ebert S.C., Watanabe Y. 1993. Differences in time above MIC ($T > MIC$) required for efficacy of beta-lactams in animal infection models. En: *Program and abstracts on the twenty-third Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Abstract 86. p. 135.
 - 43) Crump B., Wise R., Dent J. 1983. Pharmacokinetics and tissue penetration of

- ciprofloxacin. Antimicrob. Agents and Chemother., 24: 784-786.
- 44) Cuffini A.M., Tullio V., Allocco A., Giachino F., Fazari S., Carlone N.A. 1993. The entry of meropenem into human macrophages and its immunomodulating activity. J. Antimicrob. Chemother., 32: 695-703.
- 45) Curtis N.A., Orr D., Ross G.W., Boulton M.G. 1979. Competition of β -lactam antibiotics for the penicillin-binding proteins of *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *K. aerogenes*, *P. rettgeri* and *E. coli*: comparison with antibacterial activity and effects upon bacterial morphology. Antimicrob. Agents Chemother., 16: 325-28.
- 46) Daikos G.k. 1991. Continuous versus discontinuous antibiotic therapy: the role of the postantibiotic effect and other factors. J. Antimicrob. Chemother., 27: 157-160.
- 47) Dalhoff A., Stübner G. 1985. Comparative analysis of the antimicrobial action of polymorphonuclear leucocytes in vitro, ex vivo and in vivo. J. Antimicrob. Chemother., 15(Suppl.A): 283-291.
- 48) Dalhoff A., Ullmann U. 1990. Correlation between pharmacokinetics, pharmacodynamics and efficacy of antibacterial agents in animal models. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 9: 479-487.
- 49) D'Espine M., Bellido F., Pechère J.C. 1989. Serum levels of ciprofloxacin after single oral doses in patients with septicemia. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 8: 1019-1023.
- 50) Diver J.M., Wise R. 1986. Morphological and biochemical changes in *E. coli* after exposure to ciprofloxacin. J. Antimicrob. Chemother., 18(Suppl.D): 31-41.
- 51) Diver J.M., Piddock L.J.V., Wise R. 1990. The accumulation of five quinolones antibacterial agents by *Escherichia coli*. J. of Antimicrob. Chemother., 25: 319-333.
- 52) Drake T.A., Scheld W.M., Sande M.A. 1985. Effects of subbactericidal concentrations of antibiotics in experimental endocarditis. J. Antimicrob. Chemother., 15(Suppl.A): 293-296.
- 53) Eagle H. 1949. The recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. J. Clin. Invest., 28: 832-836.
- 54) Eagle H., Musselman A.D. 1949. The slow recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. J. Bacteriol., 58: 475-490.
- 55) Eagle H., Fleischman R., Musselman A.D. 1950. The bactericidal action of penicillin in vivo: the participation of the host and the slow recovery of the surviving organisms. Ann. Inter. Med., 33: 544-571.
- 56) Easmon C.S.F., Crane J.P., Blowers A. 1986. Effect of ciprofloxacin on intracellular organisms: in vitro and in vivo studies. J. Antimicrob. Chemother., 18(Suppl.D): 43-48.
- 57) Easmon C.S.F. 1989. Interaction of meropenem with humoral and phagocytic

- defences. J. Antimicrob. Chemother., 24(Supp.A): 259-264.
- 58) Ebert S.C., Craig W.A. 1993. Retain intermittent dosing of carbapenems (Author's replay). Antimicrob. Agents Chemother., 38: 159-160.
- 59) Edberg S.C., Sabath L.D. 1980. Determination of antibiotic levels in body fluids: techniques and significance. Bactericidal tests in endocarditis and other severe infections. En: Antibiotics in laboratory medicine, 1^a ed., Ed. Lorian V., Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 206-264.
- 60) Eng R.H.K., Padberg F.T., Smith S.M., Tan E.N., Cherubin C.E. 1991. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. Antimicrob. Agents Chemother., 35: 1824-28.
- 61) Erlendsdottir H., Gudmundsson S. 1992. The postantibiotic effect of imipenem and penicillin-binding protein 2. J. Antimicrob. Chemother., 30: 231-2.
- 62) Esposito S., Galante D., Barba D., et al. 1988. Efficacy and safety of ciprofloxacin in the treatment of UTIs and RTIs in patients affected by liver diseases. Infection, 16 (Suppl.1): 57-61.
- 63) Fantin B., Legget J., Ebert S., Craig W.A. 1991. Correlation between in vitro and in vivo activity of antimicrobial agents against gram-negative bacilli in a murine infection model. Antimicrob. Agents Chemother., 35: 1413-22.
- 64) Fernandes P.B. 1988. Mode of action, and in vitro and in vivo activities of fluorquinolones. J. Clin. Pharmacol., 28: 156-168.
- 65) Fernandes P.B., Shipkowitz N., Swanson R.N. 1989. Comparative efficacy of the fluorquinolones in experimental animal infections: correlation with in vitro potency and pharmacokinetics. En: Proceedings of an International Telesymposium on quinolones, Ed. Fernandes P.B., J.R. Prous Science Publishers, Barcelona, pp. 255-268.
- 66) Flückiger U., Segessenmann CH., Gerber A.U. 1991. Integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics of imipenem in a human-adapted mouse model. Antimicrob. Agents and Chemother., 35: 1905-10.
- 67) Frimodt-Moller N., Bentzon M.W., Thomsen V.F. 1986. Experimental infection with *Streptococcus pneumoniae* in mice: correlation of in vitro activity and pharmacokinetic parameters in vivo effect for 14 cephalosporins. J. Infect. Dis., 154: 511-7.
- 68) Fuentes F., Izquierdo J., Martín M.M., Barrientos S., Minguez F. 1992. In vivo postantibiotic effect: comparative study of meropenem and ciprofloxacin. En: Abstracts of the 8^o Mediterranean Congress of Chemotherapy, Athens 1992, Abstract 341, pp. 257-8.
- 69) Fuursted K. 1987. Post-antibiotic effect of ciprofloxacin on *Pseudomonas aeruginosa*. Eur. J. Clin. Microbiol., 6: 271-274.

-
- 70) Fuursted K. 1987. Post-antibiotic effect and killing activity of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B, 95: 199-202.
 - 71) García-Rodríguez J.A. 1988. Microbiología de ciprofloxacina. Drus of today, 24(Suppl.8): 1-10.
 - 72) Gellert M., Mizuchi K., O'Dea M.H. 1977. Nalidixic acid resistance: a second character involved in DNA gyrase activity. Proc. National Acad. Sci. (USA), 74: 4772-4777.
 - 73) Georgopapadakou N.H., Dix B.A., Mauriz Y.R. 1986. Possible physiological functions of penicillin binding proteins in *S. aureus*. Antimicrob. Agents Chemother., 29: 333-36.
 - 74) Gerber A.U., Craig W.A. 1981. Growth kinetics of respiratory pathogens after short exposures to ampicillin and erythromycin in vitro. J. Antimicrob. Chemother., 8: 581-591.
 - 75) Gerber A.U., Feller C., Brugger H.P. 1984. Time course of the pharmacological response of beta-lactam antibiotics in vitro and in vivo: a rationale for dosage regimens. Eur. J. Clin. Microbiol., 3: 592-597.
 - 76) Gerber A.U., Brugger H.V., Feller C., Stinzko T., Stalcher B. 1986. Antibiotic therapy of infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in normal and granulocytopenic mice: comparison of murine and human pharmacokinetics. J. Infect. Dis., 153: 90-97.
 - 77) Gerber A.U. 1988. Comparación entre dosis equivalentes de aminoglicósidos administradas en una sola dosis o repartidas en tres dosis diarias: consideraciones básicas y enfoque experimental. J. Drug Dev., 1(Supp.3): 17-24.
 - 78) Gerber A. 1993. Postantibiotic effect: an update and an outlook on clinical relevance. Current Op. Infect. Dis., 6: 751-757.
 - 79) Gobernado M., Santos M. Nov. 1988. Fluorquinolonas: Estructura, actividad in vitro, mecanismo de acción y resistencia. Medicine, Nov.(Num. extra): 33-40.
 - 80) Gottfredsson M., Erlendsdottir H., Kolka R., Gudmundsson S. 1991. Metabolic and ultrastructural effects induced by ciprofloxacin in *S. aureus* during the postantibiotic effect (PAE) phase. Scand. J. Infect. Dis., 74(Supp.): 124-128.
 - 81) Gottfredsson M., Erlendsdottir H., Kolka R., Gudmundsson A., Gudmundsson S. 1993. Ultrastructural alterations of bacteria during the postantibiotic effect. Chemotherapy, 39: 153-62.
 - 82) Gould I.M., Jason A.C., Milne K. 1989. Postantibiotic effect and bacterial killing by ciprofloxacin and imipenem alone and in combination. Rev. Infect. Dis., 11: S957-8.
 - 83) Gould I.M., Milne K., Jason A.C. 1990. Concentration-dependent bacterial killing, adaptative resistance and post-antibiotic effect of ciprofloxacin alone or in combination

- with gentamicin. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 16: 621-28.
- 84) Grimwood K., To M., Rabin H.R., Woods D.E. 1989. Inhibition of *P. aeruginosa* exoenzyme expression by subinhibitory antibiotic concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33: 41-47.
- 85) Grove D.C., Randall W.A. 1955. Assay methods of antibiotics: a laboratory manual (antibiotics monograph 2). Medical Encyclopedia, New York.
- 86) Guan L., Blumenthal R.M., Burnham J.C. 1992. Analysis of macromolecular biosynthesis to define the quinolone-induced postantibiotic effect in *E. coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36: 2118-24.
- 87) Guan L., Burnham J.C. 1992. Postantibiotic effect of CI-960, enoxacin and ciprofloxacin on *E. coli*; effect on morphology and haemolysin activity. *J. Antimicrob. Chemother.*, 35: 2617-24.
- 88) Gudmundsson S., Turnidge J., Craig W.A. 1982. Effect of different dosage regimens on in vivo efficacy of antibiotic against *Klebsiella pneumoniae*. *Clin. Res.*, 30: 777a.
- 89) Gudmundsson S., Turnidge J., Vogelmann B., Craig W.A. 1983. The postantibiotic effect in vivo. En: Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy, part. 117. Eds. K.H. Spitzzy and K. Karrer, Verlag H. Egerman, Vienna, pp. 68-71.
- 90) Gudmundsson S., Vogelmann B. and Craig W. 1984. Postantibiotic effect for newer antimicrobials. En: Program and abstracts of the twenty-fourth Interscience conference of the American Society for Microbiology, Washington D.C., p. 289.
- 91) Gudmundsson S., Vogelmann B., Craig W.A. 1986. The in-vivo postantibiotic effect of imipenem and other new antimicrobials. *J. Antimicrob. Chemother.*, 18(Supp.E): 67-73.
- 92) Gudmundsson S., Einarsson S., Erlendsdottir H.J., Moffat J., Bayer W., Craig W.A. 1993. The postantibiotic effect of antimicrobial combinations in a neutropenic murine thigh infection model. *J. Antimicrob. Chemother.*, 31(Supp.D): 177-191.
- 93) Gutmann L., Williamson R., Moreau N et al. 1985. Cross-resistance to nalidixic acid, trimethoprim, and chloramphenicol associated with alterations in outer membrane proteins of *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Serratia*. *J. Infect. Dis.*, 151: 501-507.
- 94) Hanberger H., Nilsson L.E., Kihlstrom E., Maller R. 1990. Postantibiotic effect of β -lactam antibiotics on *E. coli* evaluated by bioluminescence assay of bacterial ATP. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34: 102-6.
- 95) Hanberger H., Nilsson L.E., Maller R., Nilsson M. 1991. Pharmacodynamics of beta-lactam antibiotics on gram-negative bacteria: initial killing, morphology and postantibiotic effect. *Scand. J. Infect. Dis.*, 74(Supp.): 118-123.
- 96) Hanberger H., Nilsson L.E., Nilsson M., Maller R. 1991. Postantibiotic effect of beta-lactam antibiotics on gram-negative bacteria in relation to morphology, initial

- killing and MIC. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 10: 927-34.
- 97) Hanberger H., Nilsson L.E., Svensson E., Maller R. 1991. Synergic postantibiotic effect of mecillinam, in combination with other β -lactam antibiotics in relation to morphology and initial killing. J. Antimicrob. Chemother., 28: 523-32.
- 98) Hanberger H. 1992. Pharmacodynamic effects of antibiotics: studies of bacterial morphology, initial killing, postantibiotic effect and effective regrowth time. Scand. J. Infect. Dis., 81: 1-52.
- 99) Hanberger H., Nilsson E. 1993. Retain intermittent dosing of carbapenems. Antimicrob. Agents Chemother., 38: 159.
- 100) Hatano K., Nishino T. 1994. Morphological alterations of *S. aureus* and *S. pyogenes* exposed to cefdinir, a new oral broad-spectrum cephalosporin. Chemotherapy, 40: 73-79.
- 101) Hessen M.T., Pitsakis P.G., Levison M.E. 1988. Absence of a postantibiotic effect in experimental pseudomonas endocarditis treated with imipenem, with or without gentamicin. J. Infect. Dis., 158: 542-548.
- 102) Hessen M.T., Pitsakis P.G., Levison M.E. 1989. Absence of a postantibiotic effect in experimental left-sided *Pseudomonas aeruginosa* endocarditis treated with imipenem with or without gentamicin. 1989. En: The influence of antibiotics on the host-parasite III, Eds. G. Gillissen, W. Opferkuch, G. Peters, G. Pulverer. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 226-30.
- 103) Hessen M.T., Pitsakis P.G. and Levison M.E. 1989. Absence of a postantibiotic effect in experimental left-sided *Streptococcus faecalis* endocarditis treated with penicillin plus gentamicin. 1989. En: The influence of antibiotics on the host-parasite III, Eds. G. Gillissen, W. Opferkuch, G. Peters, G. Pulverer. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 222-225.
- 104) Hirahata Y., Kaku M., Mizukane R., Ishida K., Nobuhiko N., Matsumoto T., Tateda K., Yamaguchi K. 1992. Potential effects of erythromycin on host defense systems and virulence of *P. aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother., 36: 1922-7.
- 105) Honorato J., Suarez J.R., Azanza J.R. 1988. Farmacología clínica de las fluorquinolonas. Medicine, Nov.(Num. extra): 41-47.
- 106) Hooper D.C., Wolfson J.S. 1991. The quinolones: mode of action and bacterial resistance. En: Antibiotics in laboratory medicine, 3^a ed., Ed. Lorian V., Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 665-690.
- 107) Hunter P.A., Rolinson G.N., Witting D.A. 1973. Comparative activity of amoxycillin and ampicillin in an experimental bacterial infection in mice. Antimicrob. Agents Chemother., 15(Suppl.A): 285-293.
- 108) ICI Pharmaceuticals. 1990. Meropenem. Laboratory data.

-
- 109) Ilstrup D.M. 1990. Statistical methods in Microbiology. Clin. Microbiol. Rev., 3: 219-226.
 - 110) Ingerman M.J., Pitsakis P.G., Rosenberg A.F., Levison M.E. 1986. The importance of pharmacodynamics in determining the dosing interval in therapy for experimental *Pseudomonas* endocarditis in the rat. J. Infect. Dis., 163: 707-14.
 - 111) Isaksson B., Nilsson L., Maller R., Sörén L. 1988. Postantibiotic effect of aminoglycoside on Gram-negative bacteria evaluated by a new method. J. Antimicrob. Chemother., 22: 23-33.
 - 112) Jones R.N., Barry A.L., Gavan T.L., Washington J.A. 1985. Susceptibility tests: microdilution and macrodilution broth procedures. En: Manual of Clinical Microbiology, 4^a ed., Eds. Lennette E.H., Balows A., Hausler Jr., Shadomy H.J. American Society for Microbiology, Washington, pp. 972-977.
 - 113) Jones R.N., Barry A.L., Thornsberry C. 1989. In vitro studies of meropenem. J. Antimicrob. Chemother., 24(Supp.A): 9-30.
 - 114) Karlowsky J.A., Zhanel G.G., Davidson R.J., Zieroth S.R., Hoban D.J. 1993. In vitro postantibiotic effects following multiple exposures of cefotaxime, ciprofloxacin and gentamicin against *E. coli* in pooled human cerebrospinal fluid and Mueller-Hinton broth. Antimicrob. Agents Chemother., 37: 1154-57.
 - 115) Kikuchi K. 1991. Studies of dosing regimens and combination effects of aminoglycosides and beta-lactam in an experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. Kansenshogaku Zasshi, 65(2): 216-25.
 - 116) Kunin C.M. 1970. Binding of antibiotics to tissue homogenates. J. Infect. Dis., 121: 55-64.
 - 117) Kunin C.M. 1981. Dosage schedules of antimicrobial agents: a historical review. Rev. Infect. Dis., 3: 4-11.
 - 118) Laber G., Schutze E., Leskova R., Kolb R., Georgopoulos A. 1980. A diffusion chamber technique for measuring concentrations of antibiotics in interstitial fluids. Infection, 8: 58-62.
 - 119) Lee C., Blaser J., Burchal J.J. 1982. Postantibiotic effect (PAE) is markedly influenced by shaking conditions during exposure to antibiotics concentrations. En: Program and abstracts of the twenty-second Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, abstract 383, American Society for Microbiology, Washington D.C., p. 133.
 - 120) Legget J.E., Fantin B., Ebert S. 1989. Comparative antibiotic dose-effect relations at several dosing intervals in murine pneumonitis and thigh-infection models. J. Infect. Dis., 159: 281-292.
 - 121) Legget J.E., Ebert S., Fantin B., Craig W.A. 1991. Comparative dose-effect relations

- at several dosing intervals for beta-lactam, aminoglycoside and quinolone antibiotics against Gram-negative bacilli in murine thigh infection and pneumonitis models. *Scand. J. Infect. Dis.*, 74(Supp.): 179-84.
- 122) Lewin C.S., Morrissey I., Smith J.T. 1991. The mode of action of quinolones: the paradox in activity of low and high concentrations and activity in the environment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 10: 240-248.
- 123) Liang R., Yung R., Chiu P., Chau P.Y., Chan T.K., Lam W.K., Tood D. 1990. Ceftazidime versus imipenem-cilastatin as initial monotherapy for febrile neutropenic patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34: 1336-41.
- 124) Livermore D.M., Yang Y. 1989. Comparative activity of meropenem against *P. aeruginosa* strains with well-characterized resistance mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.*, 24(Supp.A): 149-59.
- 125) Lorian V., Waluschka A., Kim Y. 1982. Abnormal morphology of bacteria in the sputum of patients treated with antibiotics. *J. Clin. Microbiol.*, 16: 382-86.
- 126) Lorian V., Atkinson B. 1984. Bactericidal effect of polymorphonuclear leukocytes on antibiotic induced filaments of gram-negative bacilli. *J. Infect. Dis.*, 149: 719-727.
- 127) Lorian V. 1985. Low concentration of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 15(Supp.A): 15-26.
- 128) Lorian V. 1985. Phagocytosis of staphylococci after exposure to antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 16: 129-33.
- 129) Lorian V., Joyce D.M., Kim Y. 1985. Ultrastructure and reversion of bacterial filaments produced by ciprofloxacin. En: *Recent Advances in Chemotherapy - Antimicrobial Section 2, Proceedings of the 14th International Congress of Chemotherapy*, Ed. Ishigami J., University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 1545-6.
- 130) Lorian V., Tosch W., Joyce D. 1985. Weight and morphology of bacteria exposed to antibiotics. En: *The influence of antibiotics on the host-parasite II*, Eds. Adam D., Hahn H., Opferkuch W. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 65-72.
- 131) Lorian V., Ernst J., Amaral L. 1989. The post-antibiotic effect defined by bacterial morphology. *J. Antimicrob. Chemother.*, 23: 485-491.
- 132) Lorian V., Gemmell C.G. 1991. Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: effects on ultrastructure, virulence, and susceptibility to immunodefenses. En: *Antibiotics in laboratory medicine*, 3^a ed., Ed. Lorian V., Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 493-555.
- 133) Lorian V. 1993. Medical relevance of low concentrations of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 31(Supp.D): 137-148.
- 134) MacKenzie F.M., Gould I.M. 1993. The postantibiotic effect. *J. Antimicrob. Chemother.*, 32: 519-37.

-
- 135) Maiche A.G. 1991. Use of quinolones in the immunocompromised host. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 10: 361-367.
- 136) Majcherczyk P.A., Livermore D.M. 1990. Penicillin binding protein (PBP) 2 and the postantibiotic effect of carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.*, 26: 593-4.
- 137) Manek N., Andrews J.M., Wise R. 1986. The postantibiotic effect of imipenem. *J. Antimicrob. Chemother.*, 18: 641-649.
- 138) Martín Caminero M.M. 1992. EPA de aminoglicósidos y fluorquinolonas especialmente relacionado con su estudio en la experimentación animal. Tesis Doctoral. Madrid.
- 139) Mattie H., Kunst M.W. 1976. The in vivo significance of tissue concentration. *Infection*, 4: s164-s167.
- 140) Mattie H. 1981. Kinetics of antimicrobial action. *Rev. Infect. Dis.*, 3: 19-27.
- 141) Maxwell A. 1992. The molecular basis of quinolone action. *J. Antimicrob. Chemother.*, 30:409-16
- 142) Mc.Donald P.J., Craig W.A., Kunin C.M. 1976. Brief antibiotic exposure and effect on bacterial growth. *Chemotherapy*, Eds. Williams J.D., Geddes A.M. (Ny), 2: 95-102.
- 143) Mc.Donald P.J., Craig W.A., Kunin C.M. 1977. Persistent effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* after exposure for limited periods of time. *J. Infect. Dis.*, 135: 217-223.
- 144) Mc.Donald P.J., Wetherall B.L., Pruul H. 1981. Postantibiotic leukocyte enhancement: increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocyte. *Rev. Infect. Dis.*, 3: 38-44.
- 145) Meng X., Nightingale C.H., Sweeney K.R. 1991. Quantification of in-vitro post-antibiotic effect based on the mean recovery-time. II: a comparison of colony counting versus photometric methods for the determination of bacterial growth. *J. Antimicrob. Chemother.*, 28: 515-521.
- 146) Minguez F., Ramos C., Barrientos S., Loscos A., Prieto J. 1991. Postantibiotic effect of ciprofloxacin compared with that of five other quinolones. *Chemotherapy*, 37: 420-25.
- 147) Mínguez F., Izquierdo J., Martín M., Fuentes F., Prieto J. 1992. In vivo postantibiotic effect of isepamicin and other aminoglycosides in a thigh infection model in neutropenic mice. *Chemotherapy*, 38: 179-184.
- 148) Moellering R.C., Eliopoulos G.M., Sentochnik D.E. 1989. The carbapenems: new broad spectrum β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 24(Supp.A): 1-8.
- 149) Moore R.D., Lietmen P.S., Smith C.K. 1987. Clinical response to aminoglycoside therapy importance of peak concentration to minimal inhibitory concentration. *J.*

- Infect. Dis., 155: 93-99.
- 150) Morris G., Brown M.R. 1988. Novel modes of action of aminoglycoside antibiotics against *P. aeruginosa*. Lancet I, 1359-61.
 - 151) Nadler H., Pitkin D.H., Sheikh W. 1989. The postantibiotic effect of meropenem and imipenem on selected bacteria. J. Antimicrob. Chemother., 24(Supp.A): 225-31.
 - 152) Norrby S.R. 1991. Side-effects of quinolones: comparisons between quinolones and other antibiotics. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 10: 378-383.
 - 153) Odenholt I., Holm S.E., Cars O. 1988. An in vivo model for evaluation of the postantibiotic effect. Scand. J. Infect. Dis., 20: 97-103.
 - 154) Odenholt-Tornqvist I. 1989. Pharmacodynamics of beta-lactam antibiotics: studies on the paradoxical and postantibiotic effects in vitro and in animal model. Scand. J. Infect. Dis., 58(Supp.): 1-55.
 - 155) Odenholt I., Holm S.E., Cars O. 1989. Effects of benzylpenicillin on *Streptococcus pyogenes* during the postantibiotic phase in vitro. J. Antimicrob. Chemother., 24: 147-156.
 - 156) Odenholt I., Isaksson B., Nilsson L., Cars O. 1989. Postantibiotic and bactericidal effect of imipenem against *P. aeruginosa*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 8: 136-41.
 - 157) Odenholt I., Holm S.E., Cars O. 1990. Effects of supra- and sub-MIC benzylpenicillin concentrations on group A β -haemolytic streptococci during the postantibiotic phase in vivo. J. Antimicrob. Chemother., 26: 193-201.
 - 158) Odenholt-Tornqvist I., Lowding E., Cars O. 1991. Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations of β -lactam antibiotics in vitro. Antimicrob. Agents Chemother., 35: 1834-39.
 - 159) Odenholt-Tornqvist I., Lowding E., Cars O. 1992. Postantibiotic sub-MIC effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloxacin and amikacin. Antimicrob. Agents Chemother., 36: 1852-58.
 - 160) Odenholt-Tornqvist I. 1993. Studies of the postantibiotic effect and the postantibiotic sub-MIC effect of meropenem. J. Antimicrob. Chemother., 31: 881-892.
 - 161) Oshida T., Onta T., Nakanishi N. 1990. Activity of sub-minimal inhibitory concentration of aspoxicillin in prolonging the postantibiotic effect against *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother., 26: 29-38.
 - 162) Parker R.F., Marsh H.C. 1946. The action of penicillin on *Staphylococcus*. J. Bacteriol., 51: 181-186.
 - 163) Pascual A., Lopez G., Aragón J., Perea E.J. 1990. Effect of azithromycin, roxithromycin and erythromycin on human polynorphonuclear leukocyte function against *S. aureus*. Chemotherapy, 36: 422-7.

-
- 164) Pastor A., Cantón E. 1993. Efecto postantibiótico de esparfloxacino, ciprofloxacino y temafloxacino sobre *P. aeruginosa* Pas-1. Rev. Esp. Quimioter., 6: 67-70.
- 165) Phillips I., Culebras E., Moreno F., Baquero F. 1987. Induction of the SOS response by new 4-quinolones. J. Antimicrob. Chemother., 20: 631-638.
- 166) Piddock L.J.V. 1991. Mechanism of quinolone uptake into bacterial cells. J. Antimicrob. Chemother., 27: 399-403.
- 167) Renneberg J., Walder M. 1988. A mouse model for simultaneous pharmacokinetics and efficacy studies of antibiotics at sites of infection. J. Antimicrob. Chemother., 22: 51-60.
- 168) Renneberg J., Walder M. 1989. Postantibiotic effects of imipenem, norfloxacin and amikacin in vitro and in vivo. Antimicrob. Agents Chemother., 33: 1714-1720.
- 169) Rescott D.L., Nix D.E., Holden P., Schentag J.J. 1988. Comparison of two methods for determining in vitro postantibiotic effects of three antibiotics on *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother., 32: 450-453.
- 170) Rolinson G.N. 1977. Subinhibitory concentrations of antibiotics. J. Antimicrob. Chemother., 3: 111-13.
- 171) Rolinson G.N., McDonald A.C., Wilson D.A. 1977. Bactericidal action of β -lactam antibiotics on *E. coli* with particular reference to ampicillin and amoxycillin. J. Antimicrob. Chemother., 3: 541-53.
- 172) Roosendaal R., Bakker-Woudenberg I.A.J.M., Van Den Berg J.C., Michel M.F. 1985. Therapeutic efficacy of continuous versus intermittent administration of ceftazidime in an experimental *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in rats. J. Infect. Dis., 152: 373-378.
- 173) Roosendaal R., Bakker-Woudenberg I.A., van den Berghe-van Raffe M., Vink-van den Berg J.C., Michel B.M. 1989. Impact of dosage schedule on the efficacy of ceftazidime, gentamicin and ciprofloxacin in *K. pneumoniae* pneumonia and septicemia in leukopenic rats. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 8: 878-87.
- 174) Ryan D.M. 1979. Implanted cotton threads; a novel model for measuring concentration of antibiotic in tissue fluid. J. Antimicrob. Chemother., 5: 735-736.
- 175) Ryan D.M., Cars O. 1980. Antibiotic assays in muscle: are conventional tissue levels misleading as indicator of the antibacterial activity?. Scand. J. Infect. Dis., 12: 307-309.
- 176) Ryan D.M., Monsey D. 1981. Bacterial filamentation and in vivo efficacy; a comparison for several cephalosporins. J. Antimicrob. Chemother., 7: 57-63.
- 177) Ryan D.M., Cars O., Hoffstedt B. 1986. The use of antibiotic serum levels to predict concentrations in tissues. Scand. J. Infect. Dis., 18: 381-388.
- 178) Ryan D.M. 1989. Studies on the morphology of bacteria in vivo: techniques and

- chemotherapeutic implications. En: The influence of antibiotics on the host-parasite III, Eds. G. Gillissen, W. Opferkuch, G. Peters, G. Pulverer. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 55-70.
- 179) Sande M.A., Korzeniowski O.M., Allegro G.M., Brennan R.O., Zak O., Scheld W.M. 1981. Intermittent or continuous therapy of experimental meningitis due to *S. pneumoniae* in rabbits: preliminary observations on the postantibiotic effect in vivo. *Rev. Infect. Dis.*, 3: 98-109.
- 180) Sanford M.D., Jones R.N. 1993. Postantibiotic effects of E-4868 and OPC-17116. *J. Antimicrob. Chemother.*, 32: 916-7.
- 181) Schadow K.H., Simpson W.A., Christensen G.D. 1988. Characteristics of adherence to plastic tissue culture plates of coagulase-negative staphylococci exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *J. Infect. Dis.*, 157: 71-7.
- 182) Scheld W.M. 1991. Evaluation of quinolones in experimental animal models of infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 10: 275-290.
- 183) Schlaeffer F., Blaser J., Laxon J., Zinner S. 1990. Enhancement of leucocyte killing of resistant bacteria selected during exposure to aminoglycosides or quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.*, 25: 931-940.
- 184) Schmidt L.H., Walley A. 1949 The influence of the dosing regimen on the therapeutic activity of penicillin G. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 96: 258-68.
- 185) Shen L.L., Pernet A. 1985. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by analogs of nalidixic acid: the target of the drug is DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 82: 307-311.
- 186) Shibata Y., Totsuka K., Shimizu K. 1991. Postantibiotic effects and effective regrowth times of new quinolones. En: Abstracts of 17th International Congress of Chemotherapy, abstract 661, Ed. Futuramed, Berlin (Federal Republic of Germany), June 23-28.
- 187) Smith J.T. 1986. The mode of action of 4-quinolones and possible mechanisms of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, 18(Supp.D): 21-30.
- 188) Spratt B.G. 1977. Properties of the penicillin-binding proteins of *E. coli* K12. *Eur. J. Biochem.*, 72: 341-47.
- 189) Suerbaum S., Leying H., Meyer B., Opferkuch W. 1990. Influence of β -lactam antibiotics on serum resistance of K1-positive blood culture isolates of *E. coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34: 628-31.
- 190) Täuber M.G., Zak O., Scheld W.M., Hengstler B., Sande M.A. 1984. The postantibiotic effect in the treatment of experimental meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in rabbits. *J. Infect. Dis.*, 149: 575-584.
- 191) Toothaker R.D., Welling P.G., Craig W.A. 1982. An in vitro model for the study of

- antibacterial dosage regiment design. *J. Pharm. Set.*, 71: 861-864.
- 192) Totsuka K., Fukada T., Hasegawa M., Watanabe T., Shimizu K. 1989. Duration of PAEs of new quinolones. En: Abstracts of the 16th International Congress of Chemotherapy, Jerusalem, Israel, p. 28.
- 193) Traisupa A., Wongba C., Tesavibul. 1988. Efficacy and safety of a single dose therapy of a 500 mg ciprofloxacin tablet in chancroid patients. *Infection*, 16(Suppl.1): 44-45.
- 194) Vestweber K.H., Viell B., Schaff S., Scholl H. 1988. Perioperative prophylaxis in colorectal surgery: Is a single-shot with 200 mg ciprofloxacin sufficient to maintain therapeutic levels in gut tissues?. En: Ciprofloxacin: Microbiology-Pharmacokinetics-Clinical experience, Selected papers from the 6th Mediterranean Congress of Chemotherapy, Eds. Percival A. and Nicoletti G., 22-27 May, Taormina (Italy), pp. 171-174.
- 195) Vogelmann B., Gudmundsson S., Craig W. 1983. Reduced susceptibility of bacteria during the postantibiotic effect (PAE) to bactericidal antimicrobials. En: Program and abstracts of the twenty-third Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, abstract 895, American Soc. for Microbiology, Washington D.C., p. 249.
- 196) Vogelmann B.S., Craig W.A. 1985. Postantibiotic effects. *J. Antimicrob. Chemother.*, 15(Suppl.A): 37-41.
- 197) Vogelmann B., Gudmundsson S., Leggett J., Turnidge J. 1988. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *J. Infect. Dis.*, 158: 831-847.
- 198) Vogelmann B., Gudmundsson S., Turnidge J. 1988. In vivo postantibiotic effect in a thigh infection in neutropenic mice. *J. Infect. Dis.*, 157: 287-298.
- 199) Wat B., Edwards J.R., Rayner A., Grindey A.J., Harris G. 1992. In vitro activity of meropenem and imipenem against Mycobacteria: development of a daily antibiotic dosing schedule. *Tuber. Lung Dis.*, 73: 134-36.
- 200) Wilson D.A., Rounson G.N. 1979. The recovery period following exposure of bacteria to penicillins. *Chemotherapy*, 25: 14-22.
- 201) Winstanley T.G., Hastings J.G.M.. 1989. Penicillin-aminoglycoside synergy and postantibiotic effect for enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.*, 23: 189-199.
- 202) Wise R., Lister D., McNulty C.A.M. et al. 1986. The comparative pharmacokinetics and tissue penetration of four quinolones. Including intravenously administered enoxacin. *Infection*, 14: 196-202.
- 203) Wolfson J.S., Hooper D.C. 1991. Pharmacokinetics of quinolones: newer aspects. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 10: 267-274.

-
- 204) Yoshida H., Nakamura M., Bogaky M., Ito H., Kojima T., Hattori H., Nakamura S. 1993. Mechanism of action of quinolones against *E. coli* DNA-gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37: 839-45.
 - 205) Zak O., Kradolfer F. 1979. Effects of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics in experimental infections. *Rev. Infect. Dis.*, 1: 862-879.
 - 206) Zak O., Tosch W., Sande M.A. 1985. Correlation of antibacterial activities of antibiotics in vitro and in vivo in animal models of infection. *J. Antimicrob. Chemother.*, 15 (Supp.A): 273-282.
 - 207) Zak O., Sande M.A. 1988. Introduction: the role of animal models in the evaluation of new antibiotics. En: *Experimental models in antimicrobial Chemotherapy*, Ed. Academic Press. Inc., London, 1: 1-5.
 - 208) Zak O., O'Reilly T. 1990. Animal models as predictors of the safety and efficacy of antibiotics. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 9: 472-478.
 - 209) Zak O., O'Reilly T. 1991. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35: 1527-1531.
 - 210) Zhanel G.G., Davidson R.J., Hoban D.J. 1990. Reproducibility of the in-vitro postantibiotic effect of fluorquinolones against *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 26: 724-726.
 - 211) Zhanel G.G., Kim S.O., Davidson R.J., Hoban D.J., Nicolle L.E. 1993. Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin and gentamicin on the adherence of *P. aeruginosa* to Vero cells and voided uroepithelial cells. *Chemotherapy*, 39: 105-11.